

Aus der Disease Group Metabolic Diseases  
der AVENTIS PHARMA Deutschland GmbH

Eingereicht über das Institut für Pharmakologie und  
Toxikologie der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Untersuchungen zur Wechselbeziehung  
zwischen Insulinresistenz und  
intramyozellulärem Lipid  
an Ratten**

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

**Johanna Kuhlmann**

Gießen 2002

Aus der Disease Group Metabolic Diseases  
der AVENTIS PHARMA Deutschland GmbH

Betreuer: Prof. Dr. Dr. W. Kramer

Eingereicht über das Institut für Pharmakologie und  
Toxikologie der Justus-Liebig-Universität Gießen  
im Fachbereich vertreten durch: Prof. Dr. E. Petzinger

**Untersuchungen zur Wechselbeziehung  
zwischen Insulinresistenz und  
intramyozellulärem Lipid  
an Ratten**

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

**Johanna Kuhlmann**

Tierärztin aus

Reutlingen (Baden-Württemberg)

Gießen 2002

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. B. Hoffmann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. W. Kramer
2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Petzinger

Tag der mündlichen Prüfung: 28.06.2002

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>I</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
I.1	Der Typ II Diabetes	1
I.1.1	<i>Grundlagen</i>	1
I.1.2	<i>Geschichte</i>	2
I.1.3	<i>Epidemiologie</i>	2
I.1.4	<i>Pathophysiologie</i>	3
I.2	Das Hormon Insulin	4
I.3	Das Phänomen der Insulinresistenz	7
I.3.1	<i>Definition</i>	7
I.3.2	<i>Vorkommen</i>	7
I.3.3	<i>Pathogenese</i>	8
I.4	Pharmakologische Strategien zur Verbesserung der Insulinsensitivität	15
I.4.1	<i>„Klassische“ Antidiabetika</i>	15
I.4.2	<i>PPAR<math>\gamma</math> Agonisten</i>	16
I.4.3	<i>PPAR<math>\alpha</math> Agonisten</i>	19
I.4.4	<i>Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptor-Agonisten</i>	20
I.5	Problemstellung	23
I.5.1	<i>Das Phänomen der Insulinresistenz</i>	23
I.5.2	<i>Zusammenhang zwischen der Insulinresistenz und dem Lipidgehalt der Muskelzelle</i>	23
I.5.3	<i>Möglichkeiten der pharmakologischen Beeinflussung des IMCL und somit der Insulinresistenz</i>	23
<b>II</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>25</b>
II.1	Versuchstiere	25
II.1.1	<i>Wistar Ratten</i>	25
II.1.2	<i>Zucker Fatty (ZF) Ratten</i>	26
II.1.3	<i>Zucker Diabetic Fatty (ZDF) Ratten</i>	27
II.2	Studiendesign	28

## Inhaltsverzeichnis

---

II.2.1	<i>Insulinresistenz bei verschiedenen Rattenstämmen</i>	28
II.2.2	<i>Fruktose-Fütterung von Wistar Ratten</i>	28
II.2.3	<i>Rosiglitazon-Behandlung von ZF Ratten</i>	29
II.2.4	<i>Behandlung von ZF Ratten mit einem fettzellspezifischen und selektiven Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptor-Agonisten</i>	30
II.2.5	<i>Longitudinale IMCL-Messung bei ZDF Ratten mittels Magnetresonanztomographie</i>	30
II.2.6	<i>Behandlung von ZDF Ratten mit Rosiglitazon beziehungsweise mit einem PPAR<math>\alpha</math>-Agonisten</i>	31
II.3	<i>Euglykämisch-hyperinsulinämische Glukose-Clamp-Technik</i>	32
II.4	<i>Bestimmung der Stoffwechselfparameter im Plasma</i>	39
II.4.1	<i>Lipid-Parameter</i>	40
II.4.2	<i>Insulin &amp; Leptin</i>	40
II.5	<i>Bestimmung der Stoffwechselfparameter im Urin</i>	41
II.6	<i>Bestimmung der Stoffwechselfparameter in Leber und Skelettmuskel</i>	42
II.7	<i>Mikroskopische Untersuchung des M. Soleus</i>	43
II.7.1	<i>Lichtmikroskopie</i>	44
II.7.2	<i>Elektronenmikroskopie</i>	46
II.8	<i>Magnetresonanztomographische Untersuchung des M. Soleus und des M. Tibialis Anterior</i>	46
II.9	<i>Auswertung</i>	50
II.9.1	<i>Berechnung der Glukose-Infusionsrate</i>	50
II.9.2	<i>Mikroskopische IMCL-Messung</i>	51
II.9.3	<i>Magnetresonanztomographische IMCL-Messung</i>	51
<b>III</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>52</b>
III.1	<i>Insulinresistenz bei verschiedenen Rattenstämmen</i>	52
III.1.1	<i>Physiologische Parameter</i>	52

## Inhaltsverzeichnis

---

III.1.2	<i>Stoffwechselfparameter im Plasma</i>	53
III.1.3	<i>Glukose-Infusionsrate und freie Fettsäuren als Parameter der Insulinsensitivität</i>	56
III.2	Fruktose-Fütterung von Wistar Ratten	58
III.2.1	<i>Physiologische Parameter</i>	58
III.2.2	<i>Stoffwechselfparameter im Plasma</i>	59
III.2.3	<i>Stoffwechselfparameter im Gewebe</i>	61
III.2.4	<i>Glukose-Infusionsrate und freie Fettsäuren als Parameter der Insulinsensitivität</i>	61
III.2.5	<i>IMCL-Bestimmung mittels MRS</i>	63
III.2.6	<i>IMCL-Bestimmung mittels Mikroskopie</i>	64
III.3	Rosiglitazon-Behandlung von ZF Ratten	64
III.3.1	<i>Physiologische Parameter</i>	64
III.3.2	<i>Stoffwechselfparameter im Plasma</i>	65
III.3.3	<i>Glukose-Infusionsrate und freie Fettsäuren als Parameter der Insulinsensitivität</i>	67
III.3.4	<i>IMCL-Bestimmung mittels MRS</i>	69
III.3.5	<i>IMCL-Bestimmung mittels Mikroskopie</i>	69
III.4	Behandlung von ZF Ratten mit einem fettzellspezifischen und selektiven Adenosin-A <sub>1</sub> -Agonisten	71
III.4.1	<i>Physiologische Parameter</i>	71
III.4.2	<i>Stoffwechselfparameter im Plasma</i>	71
III.4.3	<i>Glukose-Infusionsrate und freie Fettsäuren als Parameter der Insulinsensitivität</i>	73
III.4.4	<i>IMCL-Bestimmung mittels Mikroskopie</i>	75
III.5	Longitudinale IMCL-Messung bei ZDF Ratten mittels Magnetresonanztomographie	75
III.6	Behandlung von ZDF Ratten mit Rosiglitazon bzw. mit einem PPAR $\alpha$ -Agonisten	77

## Inhaltsverzeichnis

---

<i>III.6.1</i>	<i>Untersuchungen zur Insulinsensitivität bei Behandlungsbeginn</i>	<i>77</i>
<i>III.6.1.1</i>	<i>Physiologische Parameter</i>	<i>77</i>
<i>III.6.1.2</i>	<i>Stoffwechselfparameter im Plasma</i>	<i>77</i>
<i>III.6.1.3</i>	<i>Stoffwechselfparameter im Gewebe</i>	<i>80</i>
<i>III.6.1.4</i>	<i>Glukose-Infusionsrate und freie Fettsäuren als Parameter der Insulinsensitivität</i>	<i>80</i>
<i>III.6.1.5</i>	<i>IMCL-Bestimmung mittels MRS</i>	<i>82</i>
<i>III.6.2</i>	<i>Behandlung mit Rosiglitazon bzw. mit einem PPAR<math>\alpha</math>-Agonisten</i>	<i>83</i>
<i>III.6.2.1</i>	<i>Physiologische Parameter</i>	<i>83</i>
<i>III.6.2.2</i>	<i>Stoffwechselfparameter im Plasma</i>	<i>85</i>
<i>III.6.2.3</i>	<i>Stoffwechselfparameter im Urin</i>	<i>89</i>
<i>III.6.2.4</i>	<i>Longitudinale Bestimmung des IMCL mittels MRS</i>	<i>91</i>
<i>III.6.3</i>	<i>Untersuchungen zur Insulinsensitivität nach viermonatiger Behandlung mit Rosiglitazon bzw. mit einem PPAR<math>\alpha</math>-Agonisten</i>	<i>95</i>
<i>III.6.3.1</i>	<i>Physiologische Parameter</i>	<i>95</i>
<i>III.6.3.2</i>	<i>Stoffwechselfparameter im Plasma</i>	<i>95</i>
<i>III.6.3.3</i>	<i>Stoffwechselfparameter im Gewebe</i>	<i>100</i>
<i>III.6.3.4</i>	<i>Glukose-Infusionsrate und freie Fettsäuren als Parameter der Insulinsensitivität</i>	<i>101</i>
<i>III.6.3.5</i>	<i>IMCL-Bestimmung mittels MRS</i>	<i>105</i>
<i>III.6.3.6</i>	<i>IMCL-Bestimmung mittels Mikroskopie</i>	<i>107</i>
<b>IV</b>	<b>Diskussion</b>	<b>108</b>
<b>IV.1</b>	<b>In vivo Insulinwirkung bei verschiedenen Tiermodellen</b>	<b>108</b>
<b>IV.2</b>	<b>Die Rolle des intramyozellulären Lipids</b>	<b>112</b>
<b>IV.3</b>	<b>Induktion der Insulinresistenz</b>	<b>124</b>
<b>IV.4</b>	<b>Pharmakologische Beeinflussung der Insulinresistenz</b>	<b>127</b>

## Inhaltsverzeichnis

---

IV.5	Ausblick_____	137
<b>V</b>	<b>Zusammenfassung_____</b>	<b>141</b>
<b>VI</b>	<b>Literaturverzeichnis _____</b>	<b>145</b>
<b>VII</b>	<b>Danksagung_____</b>	<b>159</b>
<b>VIII</b>	<b>Anhang_____</b>	<b>161</b>



## Abkürzungen

---

### Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADA	American Diabetes Association
ADD-1	Adipocyte Determination & Differentiation Factor-1
BMI	Body Mass Index
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
cAMP	cyclic Adenosine Monophosphate / zyklisches Adenosinmonophosphat
CH <sub>3</sub>	Methylgruppe
cm	Zentimeter
CoA	Coenzym A
Cr	Creatin / Kreatin
d	day / Tag
dest.	destillata / destilliert
DG	Disease Group / Indikationsgruppe
d.h.	das heißt
dl	Deziliter
DM	Diabetes Mellitus
Dr.	Doktor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure- Dinatriumsalz-Dihydrat
ELMI	Elektronenmikroskopie

## Abkürzungen

---

EMCL	Extramyocellular Lipid / Extramyozelluläres Lipid
FFA	Free Fatty Acids / Freie Fettsäuren
FS	Fettsäure
g	Gramm
GD	Glucose Disposal / Glukose-Verstoffwechslung oder -Utilisation
GIR	Glucose Infusion Rate / Glukose-Infusions-Rate
GLUT	Glukosetransporter
h	hour / Stunde
H	Hydrogenium / Wasserstoff
HDL	High Density Lipoproteins
HGP	Hepatic Glucose Production / Hepatische Glukoseproduktion
I.E.	Internationale Einheit
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IMCL	Intramyocellular Lipid / Intramyozelluläres Lipid
IRS	Insulin Rezeptor Substrat
K	Kalium
kg	Kilogramm
K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Trikaliumphosphat
kV	Kilovolt
l	Liter

## Abkürzungen

---

LCACoA	Long Chain Acyl-CoA / Aktivierte Langkettige Fettsäuren
LDL	Low Density Lipoproteins
LO	Lead Optimization
LPL	Lipoprotein Lipase
LW	Lebenswoche
M.	Musculus / Muskel
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
min	Minute
MJ	Megajoule
ml	Milliliter
mmol	Millimol
MRS	Magnetic Resonance Spectroscopy / Magnet- resonanzspektroskopie
msec	Millisekunde
mU	Milli-Unit
n	Anzahl
NADH	Nikotinsäureamid-adenin-dinukleotid, ein Koenzym Wasserstoff (H) <sup>-</sup> übertragender Enzyme des Energiestoffwechsels
N <sub>2</sub> O	Distickstoffmonoxid / Lachgas
ng	Nanogramm
NIDDM	Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus / Nicht-Insulinabhängiger Diabetes Mellitus
nm	Nanometer

## Abkürzungen

---

NMR	Nuclear Magnetic Resonance
O <sub>2</sub>	Oxygenium / Sauerstoff
o.g.	oben genannt
OP	Operation
p	Irrtumswahrscheinlichkeit / Signifikanz
P	Phosphat
PD	Privatdozent
pH	pondus Hydrogenii / „Gewicht des Wasserstoffs“ (negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen- Konzentration)
PI3	Phospho-Inositid-3
PKC	Protein Kinase C
PPAR $\alpha$	Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezep- tor alpha
PPAR $\gamma$	Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezep- tor gamma
ppm	parts per million / Millionstel
Prof.	Professor
PTP	Protein Tyrosine Phosphatase
ras-MAPK	ras-Mitogen-Activated Protein Kinase
RIA	Radioimmunoassay
s.c.	subkutan
sec	second / Sekunde
SEM	mittlerer Fehler des Mittelwertes

## Abkürzungen

---

s.o.	siehe oben
SREBP-1c	Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1c
SS	Steady State / Fließgleichgewicht
t	time / Zeit
T-Chol.	Total-Cholesterin
tCr	Total Creatin / Gesamtkreatin
TE	Echozeit
TG	Triglycerides / Triglyzeride
TNF $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
TR	Repetitionszeit
t-Test	statistischer Test
TZD	Thiazolidindione
U	Unit / Einheit
u.a.	unter anderem
USP	United States Pharmacopeia
vgl.	vergleiche
Vol.%	Volumenprozent
vs.	versus / gegen
WHO	World Health Organization
Wo.	Wochen
ZDF	Zucker Diabetic Fatty
ZF	Zucker Fatty
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ m	Mikrometer

## **I Einleitung**

### **I.1 Der Typ II Diabetes**

#### *I.1.1 Grundlagen*

Der Diabetes Mellitus stellt eine komplexe Störung des Kohlenhydrat-, Fett- und Proteinstoffwechsels dar. Er ist eine multifaktorielle Erkrankung, bei der neben einer erblichen Komponente auch Umweltfaktoren und Immunreaktionen eine Rolle spielen. Zu den manifestationsfördernden Faktoren zählen Adipositas, Fehlernährung, steigendes Lebensalter, ein Mangel an Bewegung, Stress und Infektionskrankheiten.

Als Kriterien für die Diagnose „Diabetes Mellitus“ beim Menschen definieren die World Health Organization (WHO) und die American Diabetes Association (ADA) „entweder Hyperglykämie ( $\geq 200\text{mg/dl}$ ) bei klassischer Diabetes-Symptomatik wie Polyurie, Polydipsie und Gewichtsverlust, oder Hyperglykämie im nüchternen Zustand ( $\geq 126\text{mg/dl}$ ), oder erhöhte Plasma-Glukose-Werte während eines Glukose-Toleranz-Testes ( $\geq 200\text{mg/dl}$  2h nach Gabe von 75g Glukose)“ (The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 1997). Vier Untergruppen des Diabetes Mellitus (DM) werden aufgrund ihrer Pathogenese und Ätiologie unterschieden:

1. Typ I (entspricht dem insulinabhängigen DM)
2. Typ II (entspricht dem nicht-insulinabhängigen DM)
3. Andere Typen (genetische Defekte der  $\beta$ -Zell-Funktion oder der Insulinwirkung, Erkrankungen des exokrinen Pankreas, Endokrinopathien, medikamentell oder toxisch induziert, infektiös, immunologisch, genetische Syndrome u.a.)

### 4. Gestationsdiabetes

Typ I und Typ II Diabetes sind die klinisch bedeutenden Untergruppen in den westlichen Industrieländern. Die dritte und vierte Untergruppe des DM werden auch als „sekundärer Diabetes“ bezeichnet.

#### *1.1.2 Geschichte*

Schon die Ärzte der Antike kannten den „honigsüßen Urinfluss“, so die wörtliche Übersetzung von „Diabetes Mellitus“. 1868 beschrieb Paul Langerhans in seiner Dissertation das Vorkommen von „Zellhaufen“ im Pankreas. Diese wurden 1893 nach ihm benannt.

Oskar Minkowski pankreatektomierte 1889 einen Hund und stellte bei diesem daraufhin Glukosurie fest. Daraus folgerte er, dass das Pankreas eine Substanz produziert, die essentiell für die Blutglukose-Homöostase ist und deren Fehlen den Diabetes Mellitus verursacht.

Frederick Banting und Charles Best identifizierten 1921 ein Hormongemisch, das sie Isletin nannten und das Insulin enthielt. 1923 bekamen sie dafür den Nobelpreis.

#### *1.1.3 Epidemiologie*

Der Diabetes Mellitus stellt ein wachsendes Gesundheitsproblem dar. Nach gegenwärtigen Schätzungen sind weltweit etwa 140 Millionen Menschen davon betroffen (Saltiel, 2001), und die Quote der Neuerkrankungen nimmt rapide zu. Im Jahr 2020 wird die Zahl der Diabetiker nach Schätzungen auf 250 Millionen Menschen angewachsen sein (O’Rahilly, 1997). Dabei stellt der Typ II Diabetes mit mehr als 90% der Diabetiker in den westlichen Industrieländern die weitaus bedeutsamste Form der sogenannten „Zuckerkrankheit“ dar.

Dieser vorherrschende Diabetes-Typ, der auch als „nicht-insulinabhängiger“ oder „Alters“-Diabetes bezeichnet wird, ist in seiner Anfangsphase nur durch sehr milde, für den Betroffenen oftmals nicht wahrnehmbare Veränderungen von Stoffwechselfunktionen gekennzeichnet. Deshalb bleibt der Typ II Diabetes häufig über viele Jahre undiagnostiziert. In dieser Phase kann es aber bereits zu pathologischen Veränderungen wie Retino-, Nephro-, Neuro- oder Vaskulopathien kommen.

### *1.1.4 Pathophysiologie*

Nach heutiger Kenntnis sind die beiden Hauptursachen für die Entstehung des Typ II Diabetes die Insulinresistenz sowie der Sekretionsdefekt der Pankreas- $\beta$ -Zellen. Welcher dieser Faktoren der primär zugrunde liegende ist, wird auch gegenwärtig noch kontrovers diskutiert (Unger, 1995).

Zwischen dem Auftreten von Insulinresistenz und  $\beta$ -Zell-Defekt sowie der Manifestation des Diabetes mit Hyperglykämie und Hypoinsulinämie liegt häufig eine Zeitspanne von mehreren Jahren bis Jahrzehnten (Lillioja et al., 1988; Warram et al., 1990). In dieser „prädiabetischen“ Phase mit muskulärer Insulinresistenz und veränderter Insulinsekretionskinetik des Pankreas kommt es oft schon zu ersten mikroangiopathischen Veränderungen und so zur chronischen Schädigung verschiedener Organsysteme.

Zum Zeitpunkt der Diagnose des Typ II Diabetes liegen bereits bei 20-40% der Patienten Langzeitschäden an verschiedenen Organsystemen vor.

Der Typ II Diabetes verkürzt die Lebenserwartung der Erkrankten um 9-12 Jahre. Herz-Kreislauf-erkrankungen und Herzinfarkte kom-



men bei Typ II Diabetikern zwei- bis viermal häufiger vor. Der Typ II Diabetes ist die häufigste Ursache für Erblindungen, Nierenversagen und Amputationen in den westlichen Industrieländern (Saltiel, 2001).

### **I.2 Das Hormon Insulin**

Insulin ist ein Peptidhormon, bestehend aus einer A- und einer B-Kette, welche durch zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Es wird in den Langerhans-Inseln des Pankreas von den  $\beta$ -Zellen gebildet.

Insulin und das antagonistisch wirkende Glukagon aus den  $\alpha$ -Zellen sind die bedeutsamsten Regulatoren der Blutglukosehomöostase im Organismus (Löffler & Petrides, 1997); daneben regulieren auch das Somatostatin aus den  $\delta$ -Zellen, gastrointestinale Peptidhormone sowie sympathische und parasympathische Innervation Langerhans'scher Inseln die Hormonausschüttung und somit indirekt den Blutzucker.

Bei der Synthese des Insulins wird zunächst am Ribosom Prä-Pro-Insulin gebildet, welches über das Knüpfen von Disulfidbrücken im Golgi-Apparat zu Pro-Insulin umgewandelt wird. Dann erfolgt eine Aufspaltung in die biologisch aktive Form, das Insulin, und ein C-Peptid (= connective peptide). Insulin und C-Peptid werden in äquimolarem Verhältnis in Sekretgranula gespeichert. Bei Stimulation wird das Insulin ausgeschüttet (= regulierte Exozytose); C-Peptid wird folglich in äquimolaren Konzentrationen zum Insulin freigesetzt (Löffler & Petrides, 1997).

Die Stimulation der Sekretion kann sowohl durch Metabolite wie Glukose, Arginin, Lysin, freie Fettsäuren oder Ketonkörper als auch durch Neurotransmitter (Acetylcholin) oder Peptide (Glukagon, Glu-

kagon-Like-Peptid-1, Sekretin) erfolgen. Eine Hemmung der Ausschüttung wird durch Neurotransmitter wie Adrenalin und Noradrenalin, durch das Neuropeptid Y oder auch durch Peptide (Somatostatin) hervorgerufen (Löffler & Petrides, 1997).

Die Insulinsekretion verläuft biphasisch; bei Diabetikern fehlt vor allem der erste massive Ausschüttungsspeak (Flatt et al., 1994; Francesconi, 1999).

Insulin ist das bedeutendste anabole Hormon des Organismus (Pessin & Saltiel, 2000).

Zu den wichtigsten Insulin-vermittelten Wirkungen zählen unter anderem die Steigerung des Glukosetransports in Skelettmuskel und Fettgewebe, die Steigerung der Glykogensynthese in der Leber und im Muskel, die gesteigerte Lipogenese in der Leber und im Fettgewebe, die Anti-Lipolyse im Fettgewebe, eine erhöhte Proteinbiosynthese sowie Zellwachstum und -differenzierung (Löffler & Petrides, 1997; Pessin & Saltiel, 2000).

Insulin wirkt über den Insulinrezeptor.

Dieser Tyrosinkinase-Rezeptor ist transmembranal an der Zelloberfläche von Körperzellen ausgebildet und besteht aus 2  $\alpha$ - und 2  $\beta$ -Ketten (= tetramer).

Insulin bindet an die extrazelluläre  $\alpha$ -Untereinheit; diese Insulin-Bindung sendet ein Signal über die Plasmamembran (= Transmembrandomäne) aus. Daraufhin wird intrazellulär in der  $\beta$ -Untereinheit die Tyrosin-Kinase-Aktivität des Rezeptors angeschaltet. Zwei Tyrosinreste am katalytischen Zentrum des Rezeptors werden autophosphoryliert; dadurch wird die Fähigkeit des Rezeptors ge-

steigert, Tyrosinreste in Zielproteinen, also in exogenen Substraten, zu phosphorylieren (Pessin & Saltiel, 2000).

Der aktivierte Insulinrezeptor ist somit ein Enzym. Er phosphoryliert diverse „Insulin-Rezeptor-Substrate“ (IRS), wie die IRS1-4 oder die Phospho-Inositid-3-(PI3-)Kinase; auch die ras-Mitogen-Activated Protein Kinase (ras-MAPK) und diverse Transkriptionsfaktoren (z.B. ADD-1/SREBP-1c) werden durch ihn aktiviert. Die PI3-Kinase beispielsweise verstärkt über die Aktivierung einer Lipid-Kinase die GLUT4-Translokation an die Zellmembran und somit den Glukose-Transport in die Zelle. Über Aktivierung von Transkriptionsfaktoren werden verschiedene Gene reguliert, die für Schlüsselenzyme des Kohlenhydrat- und des Fettstoffwechsels (z.B. Lipoproteinlipase, Fettsäure-(FS-)Synthase, Acetyl-CoA-Carboxylase) kodieren (Kahn & Flier, 2000).

Diese Kette von Phosphorylierungs-Reaktionen wird als „Insulin-Signalkaskade“ bezeichnet.

Die Blockade einzelner Phosphorylierungsstellen in der Signalkaskade kann nun zu verminderter Insulin-Wirkung führen (Pessin & Saltiel, 2000; Saltiel, 2001).

Hierbei kommen verschiedene Angriffspunkte in Frage, so unter anderem

- der aktivierte Rezeptor nach Autophosphorylierung,
- die „proximal insulin receptor signaling events“, d.h. Substrate zu Beginn der Signalkaskade, wie IRS, und
- die „downstream signaling events“, d.h. Substrate am Ende der Signalkaskade, wie PI3-Kinase.

Bei verminderter Tyrosin-Kinase-Aktivität zum Beispiel werden an IRS statt der Tyrosin-Bindungsstellen Serin-Threonin-Bindungsstellen phosphoryliert. Somit wird die IRS-vermittelte PI3-Kinase-Aktivierung herabgesetzt, und die GLUT4-Translokation ist vermindert. Dies resultiert in einer reduzierten Glukose-Aufnahme.

Eine identische Insulinkonzentration würde in diesem Fall nicht mehr dieselbe Wirkung erzielen.

### **I.3 Das Phänomen der Insulinresistenz**

#### *I.3.1 Definition*

Unter Insulinresistenz versteht man eine verminderte Empfindlichkeit der Gewebe (hauptsächlich Skelettmuskulatur, Leber und Fettgewebe) gegenüber dem Hormon Insulin.

„A normal dose of insulin produces less than a normal response“ (Kahn, 1978).

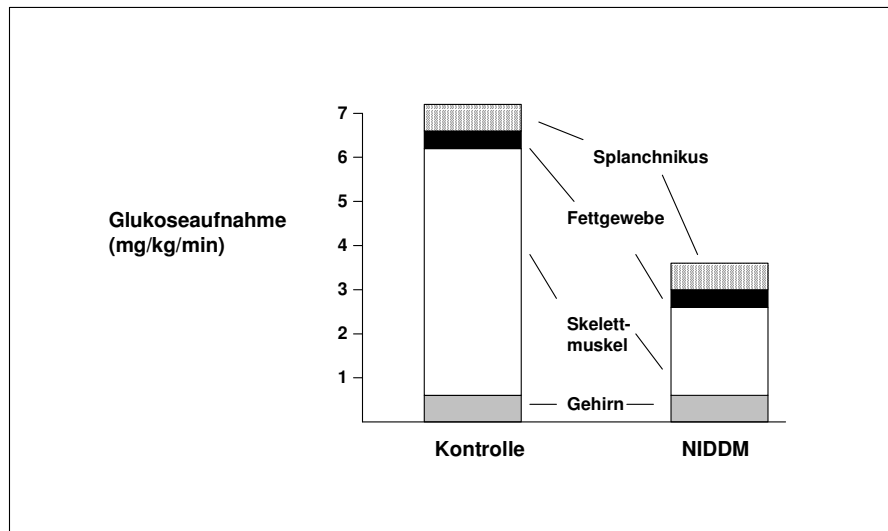
Man spricht von Insulinresistenz, wenn eine physiologische Insulinkonzentration nicht mehr in der Lage ist, die biologischen Prozesse angemessen zu steuern (Pessin & Saltiel, 2000).

#### *I.3.2 Vorkommen*

Insulinresistenz kann sich als Resistenz der Skelettmuskulatur, der Leber und des Fettgewebes darstellen (Reaven, 1997).

Der größte Teil exogen zugeführter Glukose wird vom Muskelgewebe aufgenommen. Daher hängt die periphere Insulinsensitivität in erheblichem Maße von der muskulären Glukose-Utilisation ab (siehe *Abb.I-1*).

### Glukose-Aufnahme in Körpergewebe



**Abb.I-1 Glukose-Utilisation.** Die Aufnahme von Glukose in die verschiedenen Körpergewebe unter Glukose-Clamp-Bedingungen bei Nicht-Diabetikern (Kontrolle) sowie Typ II Diabetikern (NIDDM; Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus). Die Bedeutung der Muskulatur für die Ausbildung der Insulinresistenz wird deutlich (nach DeFronzo, 1988).

Es gibt Hinweise darauf, dass die muskuläre Insulinresistenz der klinischen Manifestation des Typ II Diabetes um bis zu 30 Jahre vorausgehen kann und damit bereits im Stadium des Prädiabetes vorhanden ist (Martin et al., 1992).

#### *I.3.3 Pathogenese*

Die molekularen Mechanismen, die zu einer Insulinresistenz führen, sind bis heute noch ungeklärt (Shulman, 2000; Kahn & Flier, 2000).

Es gibt jedoch zunehmend Hinweise für eine Beteiligung von Lipiden an der Insulinresistenz (McGarry, 1992; Frayn, 1993).

Man weiß, dass Insulinresistenz einhergeht mit erhöhten Spiegeln freier Fettsäuren (FFA) im Plasma (Reaven et al., 1988; Mc Garry, 1992; Roden et al., 1996; Boden, 1997). Vor fast 40 Jahren zeigte Randle, dass freie Fettsäuren im isolierten Herz- und Zwerchfellmuskul der Ratte erfolgreich mit Glukose um die Substratoxidation konkurrieren. Daraus schlussfolgerte er, dass erhöhte FFA-Spiegel die muskuläre Glukose-Utilisation mindern und so Insulinresistenz verursachen können (Randle et al., 1963).

Randle stellte das Konzept eines „Glucose-Fatty Acid-Cycle“ auf. Als zugrunde liegenden Mechanismus postulierte er, dass erhöhte FFA-Spiegel über eine gesteigerte Verfügbarkeit und somit über eine gesteigerte Fettsäure-(FS-)Oxidation zu einer Beeinträchtigung des Glukosestoffwechsels führen (Randle et al., 1963).

Die gesteigerte  $\beta$ -Oxidation ruft eine Erhöhung intramitochondrialer Acetyl-CoA- und NADH-Konzentrationen hervor. Dieser Anstieg führt zu einer Hemmung der Pyruvatdehydrogenase und so zu einer verminderten Glykolyse. Die erhöhten Acetyl-CoA-Spiegel haben zur Folge, dass die Citratspiegel ansteigen. Erhöhte Citratspiegel hemmen die Phosphofructokinase, das Schlüsselenzym der Glykolyse. Somit akkumuliert Glukose-6-Phosphat, inhibiert als Folge die Hexokinase und hemmt damit die Glukoseaufnahme in die Zelle (Randle, 1963 und 1965; Roden et al., 1996). Diese Wechselwirkungen zwischen Glukose- und Fettsäure-Metabolismus im Muskelgewebe stellen sich in Form eines Zyklus dar, basierend auf dem Konzept der „Substratkompetition“.

Des Weiteren wurden an gesunden Probanden Studien durchgeführt, in denen eine Lipid-/Heparin-Infusion die Erhöhung der Plasma-FFA-Spiegel bewirkte. Diese erhöhten Plasma-FFA-Spiegel resultierten in einer verminderten Ganzkörper-Glukose-Utilisation (Thiebaud et al., 1982; Ferrannini et al., 1983; Lillioja et al., 1985; Kelley et al., 1993; Roden et al., 1996).

Roden et al. kamen dabei aufgrund ihrer Ergebnisse zu dem Schluss, dass im Kontrast zu dem von Randle postulierten Mechanismus die FFA vermutlich über eine Hemmung des Glukosetransportes und/oder der Glukosephosphorylierung eine Insulinresistenz hervorrufen (Roden et al., 1996). Bei dieser Theorie käme für die Hemmung des Glukosetransportes eine reduzierte GLUT4-Aktivität, für die Hemmung der Glukosephosphorylierung eine initial herabgesetzte Hexokinase-Aktivität in Frage.

Nicht nur durch Lipid-Infusion (Chalkley et al., 1998), sondern auch durch Fütterung einer Fett-Diät kann bei Ratten die Insulinsensitivität beeinträchtigt werden (Kraegen et al., 1991; Chen et al., 1992). Im Überfluss über die Nahrung zugeführte Fette konkurrieren via „Substratkompetition“ mit der Glukose als Energiesubstrat und führen zu Obesitas und Insulinresistenz in Leber und Skelettmuskulatur von Ratten (Kraegen et al., 1986; Storlien et al., 1986).

So wurde in den letzten Jahren nicht nur das erhöhte Angebot an zirkulierendem Lipid in Form von Plasma-FFA, sondern auch die Rolle von gespeichertem Lipid, welches im Skelettmuskel akkumuliert, in ursächlichem Zusammenhang mit dem Phänomen der Insulinresistenz diskutiert.

Dass Obesitas per se ursächlich eng mit dem Phänomen der Insulinresistenz verbunden ist, gilt seit Jahrzehnten als erwiesen (Unger, 1995; Koyama et al., 1997; Kahn & Flier, 2000; Unger & Orci, 2001).

Obesitas stellt eines der vorherrschenden Gesundheitsprobleme in den westlichen Industrieländern dar; aufgrund von im Überfluss vorhandener Nahrung bei bewegungsarmer Lebensform erreicht die Fettleibigkeit in der westlichen Welt zum Teil epidemische Ausmaße (National Center for Health Statistics, 1994; Mokdad, 1999).

Insulinresistenz ist nicht nur ein grundlegender Aspekt in der Entstehung des NIDDM, sondern ist auch eng verbunden mit einer Reihe anderer pathophysiologischer Zustände wie Obesitas (Ferrannini et al., 1997), Bluthochdruck, Dyslipidämie und Herz-Kreislauf-Erkrankungen (Zavaroni et al., 1989; Kahn & Flier, 2000). Das gemeinsame Vorliegen all dieser Erkrankungen wird als „Metabolisches Syndrom“, „Syndrome X“ oder Insulinresistenz-Syndrom bezeichnet (Reaven, 1997; Hansen et al., 1999).

Epidemiologische Studien zeigen, dass das Risiko, an Typ II Diabetes zu erkranken (also insulinresistent zu werden), mit der Höhe des „Body Mass Index“ [BMI = Körpergewicht in Kilogramm / Körpergröße in Meter<sup>2</sup>] als Indikator des Körper-Fettgehaltes von den schlanken zu den obesen Individuen hin ansteigt. Dies impliziert, dass die „Dosis“ an Körperfett einen wesentlichen Einfluss auf die Insulinsensitivität hat (Colditz et al., 1990).

Obesitas ist durch vermehrte Fettspeicherung in den Körpergeweben charakterisiert. Diese vergrößerten Fettdepots haben erhöhte Plasma-FFA-Spiegel zur Folge (gesteigerte FFA-Freisetzung aus der vergrößerten Fettmasse). Daraus resultieren ein vermehrter FFA-Flux



in andere Gewebe und eine vermehrte Einlagerung von Lipiden in diese Gewebe (Kahn & Flier, 2000).

Diese ektopische Ablagerung von Lipiden in Nicht-Adipozyten wird nun konzeptionell als ein bedeutender Aspekt bei der Entstehung von Insulinresistenz diskutiert (Unger & Orci, 2001).

Ein Anstieg des Triglyzeridgehaltes im Muskel wurde beispielsweise bei Ratten beobachtet, die durch Fütterung einer Fett-Diät insulinresistent geworden waren (Storlien et al., 1991).

Auch beim Menschen stellte man einen Zusammenhang zwischen erhöhtem Muskel-Lipid („intramyocellular lipid / IMCL“) und herabgesetzter Insulinsensitivität fest (Phillips et al., 1996; Forouhi et al., 1999; Perseghin et al., 1999). Es existieren somit eindeutige Hinweise auf eine negative Wechselbeziehung zwischen der Insulinsensitivität und dem in der Muskelzelle gespeicherten Fett (Phillips et al., 1996; Pan et al., 1997; Oakes et al., 1997; Koyama et al., 1997; Boden et al., 2001).

Das IMCL stellt sich als metabolisch aktiver Lipid-Pool dar, der aus vielen kleinen Fett-Droplets besteht. Diese befinden sich in unmittelbarer Nähe der Mitochondrien (Szczepaniak et al., 1999; Boden et al., 2001). Im Gegensatz dazu ist das extramyocelluläre Lipid („extramyocellular lipid“ / EMCL) entlang der Muskelfasern angeordnet; es repräsentiert adipozytäres, inertes Depotfett ohne engen Kontakt zu enzymatischen Zellkomponenten.

Somit fokussiert sich das Augenmerk klar auf den intramyozellulären Lipid-Pool.

Koyama et al. (1997) zeigten, dass bei Wistar Ratten, deren Lipidspeicher im Muskelgewebe durch Induktion einer chronischen

Hyperleptinämie komplett entleert waren, der Triglyzeridgehalt im Muskel mit dem Produkt aus dem basalen Plasma-Insulinspiegel und der basalen Blutglukose (ein ungefährender Index für die Insulinsensitivität) korrelierte. Die Insulinsensitivität war im Vergleich zu normalen Wistar Ratten in den lipopenischen Tieren deutlich erhöht (niedriges Insulin-Glukose-Produkt). Somit korrelierte der Fettgehalt im Skelettmuskel mit der Wirksamkeit des Insulins.

Aktuell wird daher die Akkumulation von Lipiden in der Skelettmuskelzelle als ein Surrogat für nachfolgende biochemische Prozesse diskutiert, welche die Insulinsensitivität der Muskelzelle herabsetzen (McGarry & Dobbins, 1999; Ellis et al., 2000; Dobbins et al., 2001). Man vermutet, dass nicht die Muskel-Lipide selbst Verursacher der Insulinresistenz sind, sondern dass eine andere, sich von ihnen ableitende Struktur die Insulinwirkung am Muskel beeinträchtigen könnte (Chalkley et al., 1998).

Hierbei rücken mehr und mehr die langkettigen aktivierten Fettsäuren („Long-Chain Acyl-CoA / LCACoA“) in den Mittelpunkt des Interesses (Prentki & Corkey, 1996; Ellis et al., 2000; Dobbins et al., 2001).

Triglyzeride werden als neutrale Fette im Muskel gespeichert, wohingegen LCACoA, die aktivierte Form der Fettsäuren, als Schlüssel-Metaboliten der Lipid-Biosynthese und der FS- $\beta$ -Oxidation potente Stoffwechsel-Modulatoren und Effektor-Moleküle darstellen (Prentki & Corkey, 1996; Corkey et al., 2000). Somit reflektieren letztere akute Veränderungen im Lipidstoffwechsel der Muskelzelle besser als die inerten Speicherlipide (Bronwyn et al., 2000). Es wurde nachgewie-

sen, dass LCACoA im Muskel insulinresistenter Individuen ebenfalls erhöht sind (Laybutt et al., 1999).

Man diskutiert, dass die LCACoA sowohl eine Rolle als Inhibitoren von Schlüsselenzymen des Glukosestoffwechsels (z.B. der Hexokinase; siehe Tippet & Neet, 1982; Powell et al., 1985; Thompson & Cooney, 2000) als auch als Aktivatoren von Protein Kinase C-(PKC-) Isoformen spielen könnten (Chalkley et al., 1998; Laybutt et al., 1999).

Die Aktivierung von PKC-Isoformen resultiert in einer verminderten IRS-1-vermittelten PI3-Kinase-Aktivierung und somit in einer herabgesetzten GLUT4-Translokation zur Zellmembran der Muskelzelle, was eine verminderte Glukoseaufnahme in die Muskelzelle als Ausdruck einer Insulinresistenz zur Folge hätte (Chen et al., 1991; Shmueli et al., 1993; Schmitz-Pfeiffer et al., 1997).

Shulman (2000) diskutiert hier folgenden molekularen Mechanismus (siehe Anhang, *Abb.VIII-1*): Erhöhte Spiegel intrazellulärer Fettsäure-Metabolite wie LCACoA, Diacylglycerol oder Ceramide aktivieren über die Proteinkinase C eine Serin-/Threonin-Kinase-Kaskade, was zur Phosphorylierung von Serin-/Threonin-Bindungsstellen an Insulin-Rezeptor-Substraten führt. Die Serin-phosphorylierten Formen der Substratproteine aktivieren nun die PI3-Kinase nicht oder nur vermindert. Normalerweise würde die PI3-Kinase über Tyrosin-phosphorylierte IRS aktiviert. Die verminderte PI3-Kinase-Aktivität resultiert in einem herabgesetzten Glukosetransport (Zierath et al., 1997; Griffin et al., 1999; Dresner et al., 1999).

Somit würde jede Störung der Stoffwechselvorgänge, die mit einer Akkumulation von intrazellulärem Lipid (und somit auch von Fettsäuremetaboliten wie z.B. LCACoA) in Nicht-Adipozyten einhergeht,

sei es durch ein erhöhtes Angebot oder durch verminderten Abbau, als potenzielle Ursache einer Insulinresistenz in Frage kommen (Shulman, 2000).

Diese Hypothese wird durch Ergebnisse einer Studie bestätigt, in der transgene lipoatrophische Mäuse untersucht wurden (Gavrilova et al., 2000). Diese Tiere erwiesen sich als extrem insulinresistent; die Insulinresistenz ging dabei einher mit erhöhtem Triglyzeridgehalt in Muskel- und Lebergewebe (Kim et al., 2000). Durch Transplantation von Fettgewebe wurde bei den Mäusen nicht nur der Fettgehalt in Muskel und Leber normalisiert, sondern auch die Insulinsensitivität.

Zusammengefasst deutet vieles darauf hin, dass die Insulinresistenz sich aufgrund einer ektopischen Ablagerung von Lipiden in Nicht-Adipozyten entwickelt. Diese intrazelluläre Akkumulation von Triglyzeriden und folglich auch von intrazellulären Fettsäuremetaboliten in auf Insulin ansprechenden Geweben resultiert in Defekten im Insulin-„Signaling“ und somit in einer verminderten Insulinwirkung.

Dies würde bedeuten, dass im Grunde jede pharmakologische Strategie oder Intervention zur Absenkung des IMCL-Gehaltes eine Verbesserung der Insulinsensitivität bewirken müsste (Dobbins et al., 2001).

## **I.4 Pharmakologische Strategien zur Verbesserung der Insulinsensitivität**

### *I.4.1 „Klassische“ Antidiabetika*

Bisher verfügbare pharmakologische Substanzen zur Therapie des Typ II Diabetes zielten entweder darauf ab, die endogene Insulinsekretion zu steigern (Sulfonylharnstoffe), die endogene Glukose-

produktion zu vermindern (Metformin), die intestinale Glukoseabsorption über eine Inhibition der Kohlenhydratverdauung zu hemmen ( $\alpha$ -Glukosidase-Inhibitoren) oder das Insulinangebot durch exogenes Insulin zu erhöhen (Wagman & Nuss, 2001).

Die periphere Insulinresistenz als ein zentrales pathophysiologisches Prinzip des Typ II Diabetes stand dabei bei keiner der genannten Substanzen im Zentrum des Wirkmechanismus.

### *1.4.2 PPAR $\gamma$ Agonisten*

Durch die Entwicklung einer neuen Substanzklasse, der so genannten Thiazolidindione (TZD), wurde erstmals versucht, die periphere Insulinwirkung per se zu verbessern (Oakes et al., 1997; Upton et al., 1998; Ide et al., 2000).

Anfang der 80er Jahre wurden die ersten TZD synthetisiert. Schon bald wurde das blutzuckersenkende und Insulinresistenz-mindernde Potenzial von Ciglitazon, einem der ersten Vertreter dieser Substanzklasse, im Tierversuch (Fujita et al., 1983) und in vitro (Kirsch et al., 1984; Kellerer et al., 1994) erkannt. Es wurde versucht, Nachfolgesubstanzen mit verbesserter pharmakologischer Wirksamkeit sowie verringerten Nebenwirkungen zu synthetisieren (Matthaei et al., 2001).

Rosiglitazon und Pioglitazon als Vertreter dieser neuen Gruppe von Antidiabetika sind seit Mitte 2000 in Deutschland zur oralen Kombinationstherapie des Typ II Diabetes (mit Metformin oder Sulfonylharnstoffen) zugelassen.

Troglitazon hingegen wurde im März 2000 wegen zum Teil tödlich verlaufender toxischer Leberschädigungen vom US-Markt genommen (Funk et al., 2001; Matthaei et al., 2001).

Die Monotherapie mit TZD führt zu einer verbesserten Glukose-Homöostase (Absenkung der Blutglukosespiegel und der Plasma-Insulinspiegel; siehe Upton et al., 1998; Okuno et al., 1998; Barman Balfour & Plosker, 1999; Matthaei et al., 2001) und zu einer Verbesserung des Lipidmetabolismus (Verminderung der Plasma-Triglyzerid-Konzentration und der freien Fettsäuren; siehe Oakes et al., 1997; Upton et al., 1998; Okuno et al., 1998; Barman Balfour & Plosker, 1999; Ide et al., 2000; Matthaei et al., 2001).

TZD verbessern die insulinvermittelte Glukoseverwertung im Gewebe (Bowen et al., 1991; Inzucchi et al., 1998; Olefsky, 2000). Sie werden daher auch als „Insulin-Sensitizer“ bezeichnet (Matthaei et al., 2001).

Als molekularer Mechanismus der TZD konnte die Aktivierung des nukleären Peroxisomen-Proliferator-aktivierten Rezeptors  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) nachgewiesen werden (Lehmann et al., 1995). Dieser Rezeptor gehört zur Familie nukleärer Steroid-Rezeptoren. Bislang wurden 3 Hauptvertreter der PPAR identifiziert:  $\alpha$ ,  $\gamma$  und  $\delta$  (Lemberger et al., 1996).

PPAR $\alpha$  wird hauptsächlich in der Leber exprimiert; seine Liganden (= PPAR $\alpha$ -Agonisten) sind als „Lipidsenker“ bekannt (siehe I.4.3).

Die Bedeutung von PPAR $\delta$  erscheint noch unklar.

Die Isoform PPAR $\gamma$ , an die TZD vorwiegend binden, ist vor allem im Fettgewebe zu finden. Durch Bindung eines endogenen (Prostaglandine, Glucocorticoide) oder eines synthetischen (TZD) Liganden (sprich Agonisten) wird der Rezeptor aktiviert. Er bildet ein Heterodimer mit dem Retinoid-X-Rezeptor. Dieser Rezeptorkomplex bindet an das Peroxisomen-Proliferator Responsive Element (PPRE), wel-

ches in der Promotor-Region verschiedener Gene lokalisiert ist (Saltiel & Olefsky, 1996; Spiegelman, 1998).

Direkt oder nach Wechselwirkung mit insulinabhängigen Transkriptionsfaktoren wird die Expression von spezifischen PPAR $\gamma$ -abhängigen und/oder insulinabhängigen Genen induziert (Olefsky, 2000). Diese Gene kodieren für verschiedene lipogene Enzyme und glukoregulatorische Proteine (Olefsky, 2000; Matthaei et al., 2001). So wird u.a. die Expression von Lipoprotein Lipase (LPL), Adipozyten-lipidbindendem Protein, AcylCoA-Synthase und GLUT4 gesteigert, während die Expression von Leptin und Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) verringert wird (Auwerx et al., 1996; Okuno et al., 1998).

Die TZD-vermittelte PPAR $\gamma$ -Aktivierung beeinflusst nicht nur Stoffwechselwege, sondern fördert auch die Differenzierung von Zellen (Olefsky, 2000). Eine Umgestaltung des Fettgewebes hin zu kleineren, insulinsensitiveren Adipozyten konnte nachgewiesen werden (Okuno et al., 1998; DeSouza et al., 2001). Diese kleinen Fettzellen sind sensibler gegenüber der antilipolytischen Wirkung des Insulin (Abbott & Foley, 1987; Okuno et al., 1998; Kahn et al., 2000). Sie sind imstande, vergleichsweise mehr Lipid einzulagern als die großen, insulin-unempfindlicheren Adipozyten (DeSouza et al., 2001).

Ein Bindeglied zwischen dem Wirkmechanismus der Fettzelldifferenzierung und der in vivo beobachteten Steigerung der Insulinsensitivität nach TZD-Behandlung könnte eine Umverteilung der Lipide aus den Nicht-Adipozyten (siehe Anhang, *Abb.VIII-2*) in die Fettdepots darstellen (Olefsky, 2000; Shulman, 2000; DeSouza et al., 2001).

### *1.4.3 PPAR $\alpha$ -Agonisten*

Die PPAR $\alpha$  stellen eine weitere bedeutsame PPAR-Isoform dar. Sie sind hauptsächlich in der Leber exprimiert. Als natürliche Liganden hat man Eicosanoide identifiziert. Synthetische Liganden sind unter anderem die Fibrate (Guerre-Millo et al., 2000; Matthaei et al., 2001), aber auch andere Substanzgruppen wurden als Agonisten identifiziert (Ye et al., 2001).

Die Fibrate sind hypolipidämische Pharmaka, die seit Jahrzehnten wirksam zur Absenkung erhöhter Plasma-Triglyzeridspiegel eingesetzt werden (Staels et al., 1998; Guay, 1999). Sie reduzieren neben der Hypertriglyzeridämie auch das Total-Cholesterin und das LDL-Cholesterin im Blut (Guay, 1999).

Via PPAR $\alpha$ -Aktivierung wird die Expression von Genen, die in den Lipid- und Lipoproteinstoffwechsel der Leber involviert sind, modifiziert (Peters et al., 1997; Kersten et al., 2000). Die veränderte Genexpression resultiert in einer gesteigerten hepatischen FS-Oxidation und in einer verminderten Synthese und Freisetzung von Triglyzeriden (Staels et al., 1998).

Als weiterer PPAR $\alpha$ -Wirkmechanismus wird eine verminderte Transkription von hepatischem Apolipoprotein C-III diskutiert (Hau-benwallner et al., 1995; Auwerx et al., 1996). Dieses Glykoprotein inhibiert die LPL-vermittelte Triglyzerid-Hydrolyse im Plasma (Wang et al., 1985). Eine Absenkung der Apolipoprotein C-III-Konzentration führt somit zu einer erhöhten Triglyzerid-Clearance und zur Absenkung der Plasma-Triglyzeride.



Neben ihrer klassischen Indikation als „Lipid-Senker“ bei Hyperlipidämie wird auch von der Anwendung der PPAR $\alpha$ -Agonisten zur Verbesserung der Insulinsensitivität berichtet (Ye et al., 2001).

In einer Studie an insulinresistenten Ratten wurde gezeigt, dass nach zweiwöchiger Behandlung mit einem PPAR $\alpha$ -Agonisten die Insulinsensitivität der Tiere deutlich verbessert war (Ye et al., 2001).

Die Behandlung führte zu einer Absenkung der Plasma-Glukose- und Triglyzeridspiegel, ebenso zu einer verminderten Plasma-Insulinkonzentration. Auch der Triglyzerid- und der LCACoA-Gehalt im Skelettmuskel wurden abgesenkt.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die PPAR $\alpha$ -vermittelte gesteigerte Lipidoxidation in der Leber und die in vivo beobachtete Verbesserung der Insulinsensitivität nach PPAR $\alpha$ -Behandlung kausal zusammenhängen (Ye et al., 2001). Ein Bindeglied könnte die Reduzierung des Lipid-Angebotes darstellen (siehe Anhang, *Abb.VIII-3*).

Somit senken sowohl PPAR $\gamma$ - als auch PPAR $\alpha$ -Agonisten zirkulierende und Speicherlipid-Spiegel, allerdings durch gänzlich unterschiedliche Mechanismen: PPAR $\gamma$ -Agonisten verschieben Lipide ins Fettgewebe, PPAR $\alpha$ -Agonisten fördern die Lipid-Verstoffwechselung in der Leber. Beide jedoch verbessern letztlich die periphere Insulinsensitivität.

### *I.4.4 Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptor-Agonisten*

Das endogene Nucleosid Adenosin ist an einer Vielzahl biologischer Effekte in vivo beteiligt. Adenosin gilt unter anderem als ein wichtiger endogener Regulator des Fettgewebsstoffwechsels (Green, 1987).

Die Effekte werden durch Interaktion mit extrazellulären Adenosin-Rezeptoren vermittelt (van Schaick et al., 1998).

Über die Aktivierung von Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptoren werden hämodynamische, zentral-depressive und auch antilipolytische Wirkungen hervorgerufen (van Schaick et al., 1998). Selektive Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptor-Agonisten wurden daher als antilipolytische Wirkstoffe entwickelt. Im Rahmen der Therapie des Typ II Diabetes können sie als Modulatoren des Lipidstoffwechsels Verwendung finden (van Schaick et al., 1998).

Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptor-Agonisten agieren über das Adenylatcyclase-System (Inhibition der Adenylatcyclase → cAMP↓ → Proteinkinase A↓ → Hemmung der Hormon-sensitiven Lipase). Sie hemmen die Lipolyse in den Adipozyten und inhibieren so die Freisetzung freier Fettsäuren, wodurch die Fettsäure- und auch die Glyzerolspiegel im Plasma sinken (Hoffman et al., 1986). Aufgrund des verringerten Angebotes an freien Fettsäuren in der Blutbahn sinkt die Konzentration an Plasma-Triglyzeriden.

In Tierversuchen bewirkten Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptor-Agonisten sowohl an normalen (Strong et al., 1993) als auch an Streptozototin-induziert diabetischen Ratten (Reaven et al., 1988) eine Absenkung der freien Fettsäuren im Blut. Jedoch traten nach peripherer Anwendung der Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptor-Agonisten starke hämodynamische Nebenwirkungen auf (Jacobson et al., 1991).

Daraufhin durchgeführte in vitro-Studien zeigten aber, dass die antilipolytische Wirkung schon bei deutlich niedrigeren Konzentrationen eintritt als die hämodynamischen Effekte (Gurden et al., 1993). Außerdem fand man heraus, dass die antilipolytische Wirkung des Adenosin bzw. seiner Agonisten über an der Plasmamembran der Adipo-

zyten lokalisierte Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptoren vermittelt wird, während die kardiovaskulären Effekte wie Bradykardie und Hypotension über kardiale (A<sub>1</sub>) und vaskuläre (A<sub>2</sub>) Rezeptoren vermittelt werden (Olsson & Pearson, 1990).

Daraufhin wurde mit der Entwicklung selektiver, fettzellspezifischer und mäßig potenter Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptor-Agonisten begonnen (Strong et al., 1993; van Schaick et al., 1998).

Sie bewirken eine Verminderung der beim Typ II Diabetes charakteristisch erhöhten Lipolyserate, ohne die unerwünschten kardiovaskulären Nebeneffekte aufzuweisen (Frayn & Coppack, 1992; Strong et al., 1993; van Schaick et al., 1998; van der Graaf et al., 1999).

Mit diesem Wirkprinzip der Antilipolyse könnte wiederum die beobachtete verbesserte Glukose-Utilisation in kausalem Zusammenhang stehen: Eine verringerte Bereitstellung freier Fettsäuren fördert die Verstoffwechslung von Glukose und führt so zu einer Verbesserung der Insulinsensitivität (Foley, 1994; Qu et al., 1997).

### **I.5 Problemstellung**

#### *I.5.1 Das Phänomen der Insulinresistenz*

Im Rahmen dieser Dissertation soll versucht werden, dem Phänomen der Insulinresistenz am Tiermodell der Ratte auf den Grund zu gehen.

Dafür wurden verschiedene Rattenstämme (insulinsensitive, insulinresistente und diabetische Tiere) verwendet und im Glukose-Clamp-Versuch (siehe II.3) auf ihre Insulinempfindlichkeit getestet.

#### *I.5.2 Zusammenhang zwischen der Insulinresistenz und dem Lipidgehalt der Muskelzelle*

Die in der Literatur beschriebene Wechselbeziehung zwischen der Insulinresistenz und dem intramyozellulär vorhandenen Lipid soll am Tiermodell der Ratte validiert werden.

Zur Verifikation dieser Hypothese wurde die Methode der in vivo IMCL-Messung mittels Magnetresonanzspektroskopie (MRS) an der Ratte etabliert. Daraufhin wurden bei verschiedenen Rattenstämmen IMCL-Messungen durchgeführt und diese mit der im Glukose-Clamp-Versuch gemessenen Insulinsensitivität verglichen.

Des Weiteren wurde der IMCL-Gehalt post mortem mikroskopisch bestimmt und mit der zuvor im Glukose-Clamp-Versuch gemessenen Insulinsensitivität verglichen.

#### *I.5.3 Möglichkeiten der pharmakologischen Beeinflussung des IMCL und somit der Insulinresistenz*

Im Rahmen dieser Arbeit soll weiterhin versucht werden, über pharmakologische Intervention zum einen den engen Zusammenhang

zwischen IMCL und Insulinresistenz darzustellen, zum anderen mögliche Mechanismen der Entstehung sowie neue Perspektiven hinsichtlich der Diagnostik und der Therapie der Insulinresistenz aufzuzeigen.

In diesem Kontext wurde die fütterungsinduzierte Insulinresistenz bei insulinsensitiven Ratten untersucht, des Weiteren wurden insulinresistente und diabetische Rattenstämme mit verschiedenen Substanzen behandelt, von denen eine Verbesserung der Insulinsensitivität erwartet wurde.

## **II Material und Methoden**

### **II.1 Versuchstiere**

Im Rahmen der Studien wurden 12 bis 18 Wochen alte männliche Wistar Ratten sowie 12 bis 16 Wochen alte männliche Zucker Fatty (ZF) Ratten und 6 bis 24 Wochen alte männliche Zucker Diabetic Fatty (ZDF) Ratten untersucht.

Die Tiere erhielten eine Diät für Ratten und Mäuse der Firma Altromin, Lage („Haltungsdiät 1320“; Inhaltsstoffe: 19% Rohprotein, 4% Rohfett, 6% Rohfaser, 7% Rohasche, 11.9MJ/kg Umsetzbare Energie), in Pellet- oder Pulverform. Futter und Wasser standen den Tieren ad libitum zur Verfügung. Im Rahmen der Studien wurde zum Teil abweichendes Futter verwendet (siehe II.2 Studiendesign).

Die Tiere wurden unter einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Zyklus in Zweiergruppen in Makrolonkäfigen der Größe 4 mit Einstreu gehalten. Die Raumtemperatur in der Versuchstieranlage betrug 18 bis 20°C bei einer Luftfeuchtigkeit von etwa 55%.

#### *II.1.1 Wistar Ratten*

Bei der Wistar Ratte handelt es sich um die Albinoform der braunen Ratte (*Rattus norvegicus*).

Die Wistar Ratte wird als Auszuchtkolonie gezüchtet. Im Gegensatz zum Inzuchtstamm ist bei Auszuchttieren eine Heterozygotie der Erbanlage vorhanden, die erhalten werden soll. Aufgrund der konstanten Heterozygotie sind die Tiere vitaler, anpassungsfähiger und fruchtbarer als die Inzuchttiere.

Das Zuchtziel ist eine definierte genetische und phänotypische Heterogenität unter Einhaltung bestimmter Variationsgrenzen über verschiedene Generationen.

Die im Rahmen der Studien verwendeten männlichen Wistar Ratten (Stamm [HsdCpb:WU]) wurden von der Firma Harlan Winkelmann, Borcheln, bezogen.

### *II.1.2 Zucker Fatty (ZF) Ratten*

Die Zucker Fatty Ratte wurde zuerst 1965 von Dr. L. M. Zucker beschrieben (Zucker, 1965); sie stammt aus einer Kreuzung von Sherman und Merck Stock M Ratten.

Die Zucker Fatty Ratte wird durch zufällige Paarung nicht miteinander verwandter heterozygoter [fa/+] männlicher und weiblicher Elterntiere gezüchtet; sie stellt somit eine Auszuchtpopulation dar.

Die homozygoten Zucker Fatty Ratten [fa/fa] haben eine autosomal-rezessive Mutation in der extrazellulären Domäne des Leptin-Rezeptors („fa“-Mutation). Diese Punktmutation führt zu Hyperphagie und Obesitas (Upton et al., 1998; Apweiler & Freund, 1993), wohingegen die heterozygoten Phänotypen schlank bleiben.

Die ZF Ratten vermeiden aufgrund einer kompensatorischen Hyperinsulinämie die Ausbildung eines manifesten Diabetes und dienen somit als Tiermodell für verminderte Glukosetoleranz und für Insulinresistenz (Karasik & Hattori, 1985; Terrettaz et al., 1983 und 1986).

Die im Rahmen der Studien verwendeten männlichen Zucker Fatty Ratten (Stamm [HsdHlr:Zucker-fa]) wurden von der Firma Harlan Winkelmann, Borcheln, bezogen.

### *II.1.3 Zucker Diabetic Fatty (ZDF) Ratten*

Die Zucker Diabetic Fatty Ratte wird seit über 30 Generationen mittels fortlaufender Inzucht gezüchtet. Inzuchttiere zeigen stammesspezifisch in hohem Maße gleiche Reaktionen. Viele polyfaktoriell bedingte Merkmale werden dadurch gefestigt und relativ konstant weitergegeben.

Die ZDF Ratte stammt von der Zucker Fatty Ratte ab; sie hat also einen Zucker-„Background“ und weist somit die Mutation im „fa“-Gen auf (Peterson, 1994).

Im Gegensatz zu der ZF Ratte schreitet die männliche ZDF Ratte aber in vorhersagbarer altersabhängiger Art und Weise fort vom hyperinsulinämischen, euglykämischen Zustand in einen hyperglykämischen, insulindefizienten Zustand (Lee et al., 1994; Zhou et al., 1999; Etgen & Oldham, 2000). Die Tiere zeigen ab etwa 12 Wochen Lebensalter die spontane Ausbildung eines manifesten Diabetes, der als Modell für den humanen Typ II Diabetes dienen kann (Sreenan et al., 1996).

Neben den obesen, diabetisch werdenden ZDF Ratten [fa/fa] wurden in den Studien auch schlanke Kontrollen ([+/+] oder [fa/+]) verwendet. Diese ZDF Ratten unterscheiden sich lediglich im Fehlen der autosomal-rezessiven „fa“-Mutation von ihren obesen Geschwistertieren.

Die im Rahmen der Studien verwendeten männlichen Zucker Diabetic Fatty Ratten (Stamm [ZDF/Gmi-fa]) wurden von der Firma Genetic Models Inc., Indianapolis, USA, bezogen.



### **II.2 Studiendesign**

Alle Tiere wurden im Hinblick auf das Vorkommen und die pharmakologische Beeinflussbarkeit der Insulinresistenz mittels Glukose-Clamp-Versuch (siehe II.3) untersucht, bei einem Teil der Tiere wurden zusätzlich magnetresonanzspektroskopische und/oder mikroskopische Untersuchungen hinsichtlich des Vorhandenseins von IMCL durchgeführt.

Je nach Versuchsdesign wurde ein Teil der Tiere mit einer Sonderdiät, mit einem „Insulin-Sensitizer“ oder mit verschiedenen Testsubstanzen vorbehandelt.

#### *II.2.1 Insulinresistenz bei verschiedenen Rattenstämmen*

Männliche Wistar, ZF und ZDF Ratten wurden in verschiedenen Altersstufen mittels Glukose-Clamp-Versuch hinsichtlich ihrer Insulinsensitivität getestet. Die untersuchten ZF Ratten dienten dabei gleichzeitig als Kontrolltiere für die Rosiglitazon-Studie (vgl. II.2.3).

#### *II.2.2 Fruktose-Fütterung von Wistar Ratten*

6 männliche Wistar Ratten wurden über 8 Wochen mit einer Fruktose-haltigen Sonderdiät („Fruktose-Diät C1068“, Firma Altromin, Lage; Inhaltsstoffe: 17% Rohprotein, 10% Rohfett, 3% Rohfaser, 59% Fruktose, 1% Disaccharide, 16.6MJ/kg Umsetzbare Energie) gefüttert. Die entsprechende Kontrollgruppe, bestehend aus 7 Tieren, erhielt ein isokalisches Kontrollfutter („Kontrolldiät C1000“; anstelle der Fruktose 60% Disaccharid-Gehalt). Mit der Fütterung der Fruktose-Diät wurde versucht, bei den Tieren eine Insulinresistenz zu induzieren (vgl. Thorburn et al., 1989).

Futter- und Wasseraufnahme sowie die Körpergewichtsentwicklung wurden wöchentlich protokolliert, außerdem wurden nach fünfwöchiger Fütterung der Fruktose-Diät die Blutglukose-, FFA-, Plasma-Triglyzerid- und Cholesterolspiegel bestimmt.

Nach der achtwöchigen Fütterungsperiode wurden die Tiere mittels MRS auf das Vorhandensein von IMCL untersucht. Dann wurde im Glukose-Clamp-Versuch ihre Insulinsensitivität bestimmt. Im Anschluss wurde der M. Soleus entnommen und mikroskopisch auf das Vorhandensein von IMCL untersucht.

### *II.2.3 Rosiglitazon-Behandlung von ZF Ratten*

8 männliche Zucker Fatty Ratten wurden über 3 Wochen mit dem „Insulin-Sensitizer“ Rosiglitazon (Avandia®, Firma Smith Kline Beecham Pharma, München), einem PPAR $\gamma$ -Agonisten, behandelt. Die Substanz wurde mit dem Futter (Standardfutter in Pulverform) verabreicht. Die Dosierung betrug 7mg Rosiglitazon/kg/Tag.

Die Kontrollgruppe bestand aus 8 Tieren. Diese Kontrolltiere waren identisch mit den ZF Ratten, die in der Studie „Insulinresistenz bei verschiedenen Rattenstämmen“ (vgl. II.2.1) untersucht wurden.

Futter- und Wasseraufnahme sowie die Körpergewichtsentwicklung der Tiere wurden wöchentlich protokolliert.

Nach der dreiwöchigen Behandlung wurde im Glukose-Clamp-Versuch die Insulinsensitivität der Ratten beurteilt. Am Ende des Versuchs wurde der M. Soleus einer Hintergliedmaße entnommen für die anschließende mikroskopische Untersuchung auf das Vorhandensein von IMCL. Die andere Hintergliedmaße wurde vom Tierkörper abgesetzt und eingefroren, um später den Soleusmuskel mittels MRS auf seinen IMCL-Gehalt zu untersuchen.

### *II.2.4 Behandlung von ZF Ratten mit einem fettzellspezifischen und selektiven Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptor-Agonisten*

8 männlichen Zucker Fatty Ratten wurde am Vorabend des Glukose-Clamp-Versuchs der selektive und fettzellspezifische Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptor-Agonist ARA in Form einer Suspension in 1%iger Tylose mit der Schlundsonde verabreicht. Danach wurden die Tiere auf Hunger gesetzt. Zum Zeitpunkt  $t=-1h$  des Glukose-Clamp-Versuchs wurde ihnen das Präparat nochmals i.p. injiziert (vgl. *Abb.II-2*). Die Dosierung betrug 10mg/kg.

Die Kontrollgruppe bestand aus 8 Tieren.

Im Glukose-Clamp-Versuch wurde die Insulinsensitivität der Ratten gemessen. Danach wurde der M. Soleus einer Hintergliedmaße entnommen und mikroskopisch auf das Vorhandensein von IMCL untersucht.

### *II.2.5 Longitudinale IMCL-Messung bei ZDF Ratten mittels Magnetresonanzspektroskopie*

10 obese und 10 schlanke männliche ZDF Ratten wurden über einen Zeitraum von 4 Monaten mittels Magnetresonanzspektroskopie (MRS) hinsichtlich des IMCL-Gehaltes im M. Soleus und im M. Tibialis Anterior untersucht.

Die Messungen erfolgten im Alter von 6, 8, 10, 14, 18 sowie 22 Wochen.

### *II.2.6 Behandlung von ZDF Ratten mit Rosiglitazon beziehungsweise mit einem PPAR $\alpha$ -Agonisten*

Zu Beginn der Behandlungsperiode wurden 5 obese und 5 schlanke, 6 Wochen alte männliche ZDF Ratten als Kontrollen nach der MRS-Messung des IMCL-Gehaltes im M. Soleus und im M. Tibialis Anterior mittels Glukose-Clamp-Versuch hinsichtlich ihrer Insulinsensitivität untersucht.

Jeweils 8 obese, 6 Wochen alte männliche ZDF Ratten wurden über 17 Wochen mit Rosiglitazon (Avandia®, Firma Smith Kline Beecham Pharma, München) bzw. mit dem PPAR $\alpha$ -Agonisten PAA, eingemischt in Standard-Pulverfutter, behandelt.

Die Dosierung betrug 3 (Rosiglitazon) bzw. 20 (PAA) mg/kg/Tag.

Die Kontrollgruppe bestand aus 8 obesen und 8 schlanken Tieren derselben Altersgruppe.

Futter- und Wasseraufnahme der Ratten sowie ihre Körpergewichtsentwicklung wurden wöchentlich protokolliert, ebenso wurden alle 14 Tage die Blutglukose, die Plasma-Triglyzerid- und Insulinspiegel sowie alle 6 Wochen Glukose und Albumin im Urin bestimmt.

Bei den Tieren wurde in regelmäßigen Abständen das IMCL im M. Soleus und im M. Tibialis Anterior mittels MRS gemessen; nach der viermonatigen Behandlung wurde im Glukose-Clamp-Versuch die Insulinsensitivität der Ratten beurteilt. Danach wurde der M. Soleus entnommen und mikroskopisch auf das Vorhandensein von IMCL untersucht.

### **II.3 Euglykämisch-hyperinsulinämische Glukose-Clamp-Technik**

Die so genannte „Glukose-Clamp-Technik“ wird zur Messung der Insulinsensitivität in vivo angewandt (DeFronzo et al., 1979). Sie ist die „Golden Standard“-Methode für die Bestimmung der Ganzkörper-Glukose-Utilisation.

Im gesunden Organismus führt eine Insulin-Infusion physiologischerweise zu einem Blutglukose-Abfall. Bei einem insulinresistenten Individuum ist der Blutzuckerabfall vermindert, was auf eine Resistenz der Körpergewebe gegenüber der Insulinwirkung schließen lässt.

Das Prinzip der Clamp-Technik besteht darin, die Plasma-Insulinkonzentration akut auf ein Plateau anzuheben und dann auf diesem Niveau zu halten. Diese Plasma-Insulinspiegel-Erhöhung würde in einer ausgeprägten, sich rasch entwickelnden Hypoglykämie münden, wenn die Plasma-Glukose-Konzentration nicht durch eine variable Glukose-Infusion auf euglykämischem, d.h. physiologischem, Niveau gehalten würde.

Die euglykämisch-hyperinsulinämische Glukose-Clamp-Technik (kurz: Glukose-Clamp-Versuch) setzt sich somit aus einer festgelegten Insulin-Infusion und einer variablen Glukose-Infusion zusammen.

Die infundierte Glukosemenge (Glukose-Infusions-Rate = GIR) unter euglykämischen Steady-State-Blutglukose-Bedingungen ist ein Maß für die muskuläre Glukose-Utilisation und die Suppression der hepatischen Glukoseproduktion (HGP) als Indikator für die Ganzkörper-Insulinsensitivität.

Die Glukose-Clamp-Versuche wurden im Rahmen der Studien als terminale Versuche an über Nacht gehungerten Ratten durchgeführt. Pro Tag wurde ein Tier „geclamt“.

Zunächst wurde die Ratte mit Pentobarbital (Narcoren®, Firma Merck, Halbermoos; 16g Pentobarbital-Natrium/100ml) narkotisiert (50-60mg/kg i.p.). Die Narkose wurde über eine subkutane Dauerinfusion (20-25mg/kg/h) über einen Zeitraum von 6 Stunden aufrechterhalten (je zwei Stunden für Vorlauf, erste und zweite Insulin-Infusionsrate).

Die Ratte wurde mittels einer Wärmeplatte mit rektalem Temperaturfühler auf 37.2°C Körperinnentemperatur gehalten.

Zur Durchführung der Operation wurden zwei chirurgische Scheren, eine feine Schere, eine chirurgische und zwei anatomische Pinzetten, eine Arterienklemme, zwei feine anatomische Pinzetten, ein Wundspreizer, ein Skalpellhalter mit Einmal-Skalpellklingen sowie eine Mikro-Federschere benötigt (Operationsbesteck der Firma Aesculap, Tuttlingen).

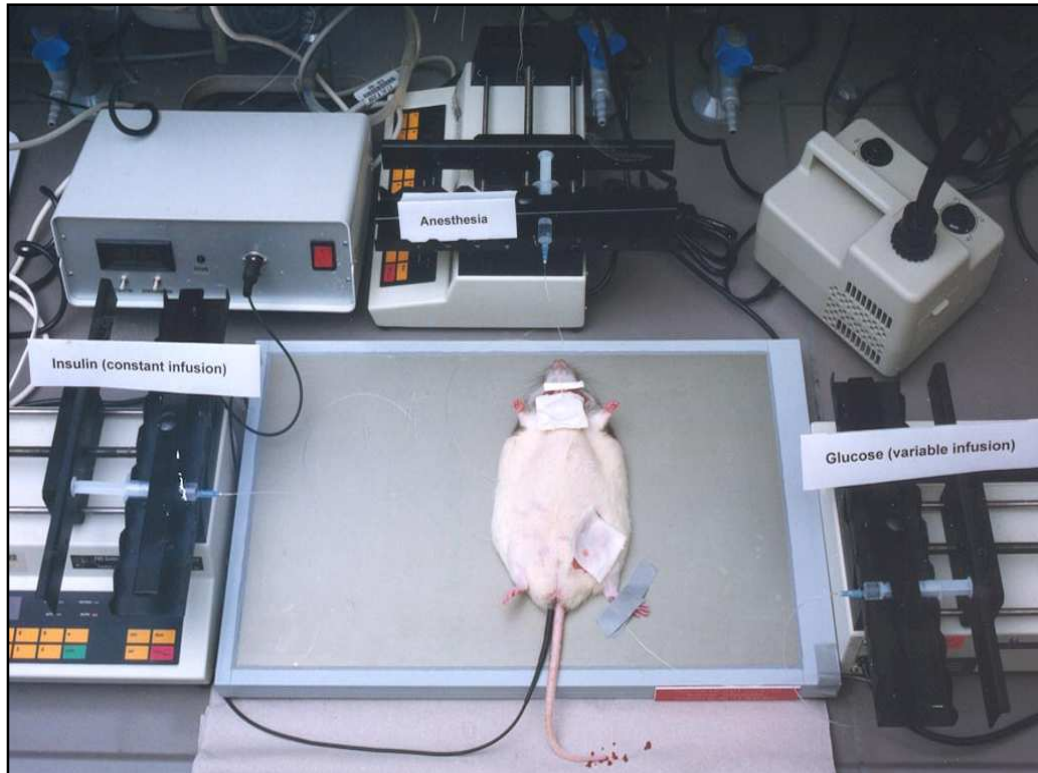
Die Ratte wurde in Rückenlage auf der Wärmeplatte fixiert. Als Lichtquelle diente eine Kaltlichtlampe (Firma Schott, Mainz). Zunächst wurde ein Hautschnitt an der Halsunterseite durchgeführt. Die Jugularvenen wurden freipräpariert. Dann wurden in der Medianen die Speicheldrüsen entfernt und der M. Sternohyoideus und Omohyoideus auseinandergespreizt (siehe Olds, 1984). Um die freipräparierte Trachea wurde ein Seidenfaden (3-0 USP; Firma Ethicon, Norderstedt) geführt. Mit der feinen Schere wurde die Tracheotomie durchgeführt; ein auf 1.5cm Länge zurechtgeschnittenes kleinlumiges PE-Schlauchstück (Ø 1.67mm; Portex Fine Bore Polyethylene Tubing, Firma SIMS Portex GmbH, Großbritannien) wurde in die Trachea eingeführt und mit dem

vorgelegten Faden fixiert.

Dann wurde in die rechte Jugularvene ein Katheter, bestehend aus einer Luer-Kanüle (Nr.16; Firma Terumo Europe, Leuven, Belgien) und einem PE-Schlauch ( $\varnothing$  0.75mm; Portex Fine Bore Polyethylene Tubing, Firma SIMS Portex GmbH, Großbritannien) mit angehängter 5ml-Spritze, die 15%ige Glukose-Lösung (1.5g reine D(+)-Glukose Monohydrat [Firma Riedel-de Haen, Seelze] ad 10ml Aqua bidest [Millipore Ultra Pure Water System, Firma Millipore SA, Molsheim, Frankreich]) enthielt, eingeführt. Dafür wurde die Jugularvene durch den darüberliegenden M. Pectoralis hindurch kannuliert. Schließlich wurde das Operationsfeld mit einem angefeuchteten Zellstofftupfer abgedeckt.

Weiterhin wurde im linken Schenkelspalt ein Hautschnitt durchgeführt. Das Operationsfeld wurde mit dem Wundspreizer und einer Klemme gespreizt. Die linke Femoralisvene wurde freipräpariert. Im Abstand von etwa einem Zentimeter wurden zwei Ligaturen mit Seidenfaden (4-0 USP; Firma Ethicon, Norderstedt) vorgelegt. Dann wurde mit der distalen Ligatur das Gefäß unterbunden. Eine Inzision der Femoralisvene wurde knapp oberhalb der distalen Ligatur mit der Mikro-Federschere vorgenommen. Nach Sistieren der Blutung wurde ein kleinlumiger PE-Schlauch ( $\varnothing$  0.4mm; Portex Fine Bore Polyethylene Tubing, Firma SIMS Portex GmbH, Großbritannien) mit anhängender 1ml-Spritze, gefüllt mit 0,9% NaCl (9g Natriumchlorid [Firma Riedel-de Haen, Seelze] ad 1000ml Aqua bidest), eingeführt. Daraufhin wurde die vorgelegte proximale Ligatur fixiert. Somit war der venöse Zugang für die 2-Stufen-Insulin-Infusion gelegt. Der Wundbereich wurde mit einem angefeuchteten Zellstofftupfer abgedeckt (siehe *Abb.II-1*).

## Aufbau des Glukose-Clamp-Versuchs



**Abb. II-1 Glukose-Clamp-Versuch an der Ratte : Zwei Venenkatheter für die konstante Insulin- und die variable Glukose-Infusion, venöser Zugang für Blutentnahmen, subkutane Pentobarbital-Infusion, gekappte Schwanzspitze für die Blutglukose-Messung, Rektalthermometer und Wärmeplatte, Tracheotubus (nach DeFronzo et al., 1979).**

Die 5ml-Spritze mit Insulin wurde erst kurz vor dem Start der zweistufigen Insulin-Infusion ( $t=0h$ ) anstelle der NaCl-Spritze angehängt; vorher wurde die Vene in regelmäßigen Abständen mit geringsten Volumina Kochsalzlösung durchspült.

Es wurde gentechnisch hergestelltes Humaninsulin (Insuman® Rapid 40 I.E./ml, Firma Aventis Pharma, Frankfurt) verwendet. Dieses wurde in 0.1% BSA (0.1g Bovines Serumalbumin [Firma Sigma



Aldrich, Deisenhofen] ad 100ml 0.9% NaCl) auf die erforderliche Konzentration verdünnt (4.8 bzw. 9.6mU/kg/min). Vor dem Ansetzen des Insulins wurden die verwendeten Schläuche, Glasgefäße und Spritzen über Nacht mit 0.5% BSA benetzt, um einem Haften des Insulins an der Oberfläche der Materialien vorzubeugen.

Die Infusionen (Pentobarbital, Glukose, Insulin) liefen über Infusionspumpen (Harvard Pump Multi Syringe, Firma FMI, Egelsbach).

Sobald die Tiere operiert waren und die Katheter lagen, begann der sechsstündige Glukose-Clamp-Versuch ( $t = -2h$ ; siehe *Abb.II-2*).

Während der initialen zweistündigen Kontrollphase wurde alle 15min. aus jeweils einem Tropfen Schwanzspitzenblut die Blutglukose-Konzentration mit einem Glukose-Messgerät (Glucometer Elite® und Glukose-Messsensoren [Zusammensetzung: Glukoseoxidase, Kaliumhexacyanoferrat, nicht-reaktive Bestandteile], Firma Bayer Vital, Leverkusen) bestimmt und notiert. Dafür wurde zu Versuchsbeginn die äußerste Spitze des Schwanzes mit der Schere gekappt.

Zum Zeitpunkt  $t=0h$  wurde aus der linken Jugularvene Blut für die Insulin- und Lipidstoffwechselfparameter-Bestimmung entnommen (~0.8ml). Hierfür wurde mit einer Luer-Kanüle (Nr.16; Firma Terumo Europe, Leuven, Belgien) durch den darüberliegenden M. Pectoralis hindurch die Vene punktiert. Außerdem wurde zu diesem Zeitpunkt die Insulin-Infusion an den in der Femoralisvene liegenden Katheter angehängt und gestartet. Zunächst lief sie für 5min. mit einer Dosierung von 48mU/kg/min. Danach wurden bis zum Zeitpunkt  $t=2h$  4.8mU/kg/min infundiert.

Die variable Glukose-Infusion wurde gestartet, sobald der Blutglukosespiegel unter 5mmol/l abzusinken drohte.

Die Blutglukose wurde mit dem Start der Insulin-Infusion alle 5min. mittels Glucometer gemessen und die Glukose-Infusionsrate dementsprechend verändert. Ziel war das Aufrechterhalten eines konstanten Blutglukosespiegels von etwa 5mmol/l.

Nach den 2h Infusion der niedrigeren Insulinkonzentration wurde zum Zeitpunkt  $t=2h$  erneut Blut zur Insulinbestimmung und zur Bestimmung der Lipidstoffwechsel-Parameter aus der Jugularvene entnommen (= Endwert der 4.8mU/kg/min).

Gleichzeitig wurde die Rate der Insulin-Infusion für 5min. auf 96mU/kg/min erhöht, dann wurden 9.6mU/kg/min als Dauerinfusion über die letzten 2h infundiert.

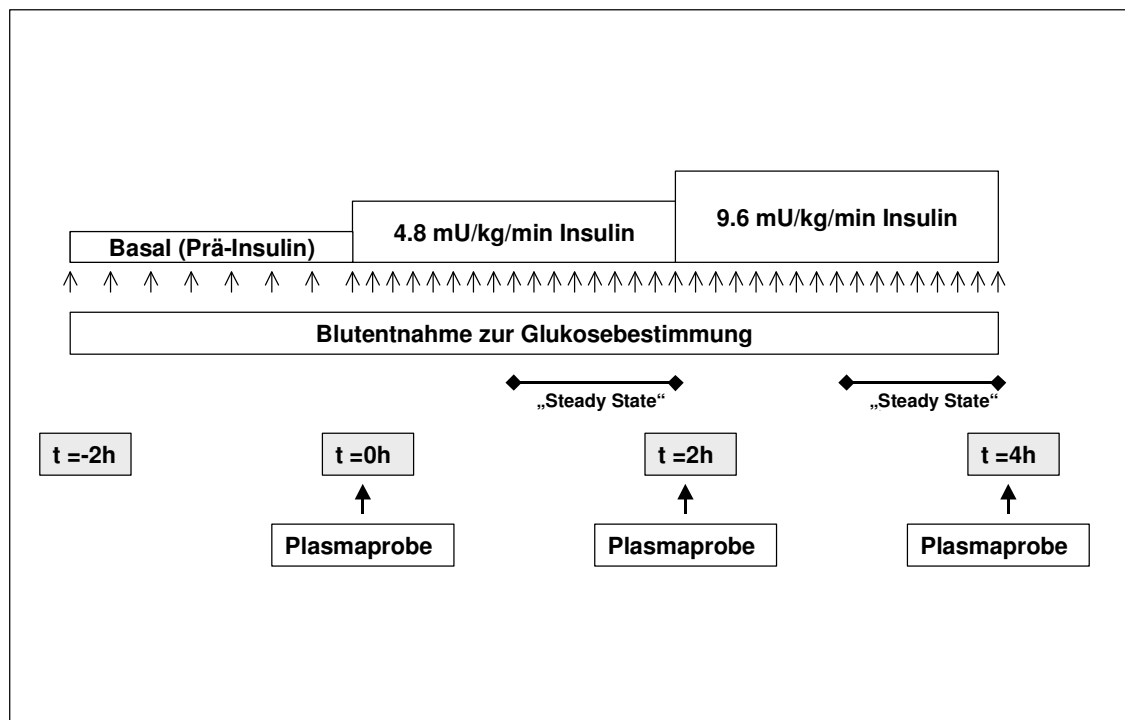
Die Blutglukose wurde weiterhin alle 5min. gemessen und dementsprechend die GIR eingestellt.

Zum Zeitpunkt  $t=4h$  wurde ein letztes Mal Blut aus der Jugularvene entnommen (= Endwert der 9.6mU/kg/min).

Am Ende der Clamp-Studie wurden die Tiere dann mit einer i.p. verabreichten Überdosis Pentobarbital getötet.

Im Rahmen der Fruktose-Fütterung von Wistar Ratten (vgl. III.2) wurde im terminalen Glukose-Clamp-Versuch ein abweichendes Insulin-Infusionsprotokoll verwendet. Insulin wurde hier in der Dosierung 2.4 (erste Insulin-Infusionsstufe) bzw. 4.8mU/kg/min. (zweite Insulin-Infusionsstufe) infundiert. Diese Änderung der Insulin-Infusionsrate wurde vorgenommen, da die Wistar Ratte als insulin-sensitiver Organismus im Unterschied zu den insulinresistenten ZF und ZDF Ratten extrem empfindlich auf das Insulin reagiert.

## Versuchsprotokoll des Glukose-Clamp-Versuchs



**Abb.II-2 Schematische Darstellung des Glukose-Clamp-Versuchs :** nach der 2-stündigen Basalphase beginnt die 4-stündige Zwei-Stufen-Insulin-Infusion. Zu 3 Zeitpunkten ( $t=0h$ ,  $2h$ ,  $4h$ ) werden Plasmaproben entnommen, alle 5min. (basal alle 15min.) wird die Blutglukose gemessen und dementsprechend die Glukose-Infusion eingestellt. Abweichend wurde im Rahmen des Glukose-Clamp-Versuchs an den Fruktose-gefütterten Wistar Ratten Insulin mit 2.4 sowie 4.8mU/kg/min. infundiert.

### **II.4 Bestimmung der Stoffwechselfparameter im Plasma**

Die Blutproben im Verlauf des Glukose-Clamp-Versuchs wurden aus der Jugularvene entnommen und in Kalium-EDTA-Röhrchen gesammelt.

Im Rahmen der Fruktose-Fütterung von Wistar Ratten sowie der Behandlung von ZDF Ratten mit Rosiglitazon beziehungsweise mit dem PPAR $\alpha$ -Agonisten PAA wurde den Tieren retroorbital Blut entnommen (van Herck et al., 1998). Dafür wurden die Ratten über eine Narkosemaske mit 4 Vol.% Isofluran und einem 1:2 O<sub>2</sub>:N<sub>2</sub>O-Gemisch in einem halboffenen Narkose-System („Titus“, Firma Dräger, Lübeck) narkotisiert. Das Blut wurde mit 20 $\mu$ l-Mikropipetten (Firma Brand, Wertheim) aus dem orbitalen Venenplexus in Kalium-EDTA-Röhrchen gewonnen.

Alle Proben wurden in einer Kühlzentrifuge („Biofuge Fresco“, Firma Heraeus Med, Hanau) bei 4°C und 5000 Umdrehungen/Minute 4min. lang zentrifugiert. Dann wurde das Plasma abpipettiert.

Im Plasma wurden Triglyzeride, Glyzerin, freie Fettsäuren, Total-Cholesterin, Insulin und teilweise Leptin gemessen. Diese Bestimmungen wurden in einem biochemischen Analysenlabor der Gruppe „Biomarker“ der Abteilung „Lead Optimization“ (LO) der Aventis Pharma Deutschland GmbH unter der Leitung von Dr. M. Gerl sowie in einem pharmakologischen Labor der Disease Group (DG) „Metabolic Diseases“ der Aventis Pharma Deutschland GmbH unter der Leitung von Prof. Dr. J. Sandow durchgeführt.

### *II.4.1 Lipid-Parameter*

Triglyzeride, Glyzerin, freie Fettsäuren und Total-Cholesterin wurden mit einem Analyzer („Roche / Hitachi 912“; Firma Hoffmann-La Roche, Mannheim) im Labor Dr. M. Gerl gemessen. Dieser vollautomatische, computergesteuerte Analyzer wurde für die Klinische Chemie konzipiert. Der Durchsatz beträgt maximal 360 Tests/h.

Es wurden folgende Test-Kits verwendet: „NEFA C“ (Firma Wako Chemicals, Neuss), ein enzymatischer Farbstest zur quantitativen in vitro-Bestimmung der freien Fettsäuren im Plasma; „GY 105“ (Firma Randox Laboratories, Krefeld), ein direktes kolorimetrisches Verfahren zur Glyzerinbestimmung im Plasma; „TG GPO-PAP“ (Firma Roche Diagnostics, Mannheim), ein enzymatischer in vitro-Test zur quantitativen Bestimmung von Triglyzeriden im Plasma; des Weiteren der enzymatische in vitro-Test „Cholesterin CHOD-PAP“ (Firma Roche Diagnostics, Mannheim) zur quantitativen Bestimmung von Cholesterin im Plasma.

### *II.4.2 Insulin & Leptin*

Insulin und Leptin wurden mittels Radioimmunoassay (RIA) im Labor Prof. Dr. J. Sandow bestimmt.

Der RIA stellt eine analytische Methode zur Bestimmung kleinster Substanzmengen in biologischen Materialien dar; er bedient sich der Spezifität immunologischer Reaktionen und des empfindlichen Nachweises von Radioisotopen. Er wird als Routineverfahren in der Diagnostik, vor allem in der Endokrinologie, verwendet.

Es wurden der „Sensitive Rat Leptin Ria Kit“ und der „Sensitive Rat Insulin Ria Kit“ (Firma Linco Research Inc., St. Charles, USA) verwendet. Beide basieren auf dem Prinzip der Antigen-Antikörper-

Reaktion: die Probe wurde mit Assay-Puffer und Ratten-Hormon-Antikörpern 24h lang inkubiert. Dann wurde  $^{125}\text{Jod}$ -markiertes Ratten-Hormon (Leptin bzw. Insulin) hinzugegeben und erneut 24h inkubiert. Schließlich wurde die Trennung von freiem und gebundenem Antigen mittels Polyethylenglykol durchgeführt. Das entstandene Immunpräzipitat wurde abzentrifugiert und mit dem Überstand das freie Antigen dekantiert. Die Radioaktivität des im Röhrchen verbliebenen Präzipitats wurde in einem Gamma-Counter gemessen (LKB-Wallac „1277 Gammamaster“, Automatic Gamma Counter, Firma Wallac Distribution, Freiburg), einem 10-Kanal-Meßgerät mit automatischer Abgleichung bei einer Zählausbeute von 65.7%.

Zur RIA-Auswertung wurde das RIA-CALC-Programm benutzt.

### **II.5 Bestimmung der Stoffwechselparameter im Urin**

Im Rahmen der Behandlung von ZDF Ratten mit Rosiglitazon beziehungsweise mit dem PPAR $\alpha$ -Agonisten PAA wurden bei den Tieren im Alter von 6, 13 und 19 Wochen Glukose und Albumin im Urin bestimmt, um so eine Aussage über die Nierenfunktion zu erhalten.

Die Tiere wurden für 24h in standardisierte Einzel-Stoffwechselkäfige (Firma Tecniplast, Italien) verbracht. Sie hatten freien Zugang zu Futter und Trinkwasser. Der über 24h ausgeschiedene Urin wurde separat aufgefangen.

Die Messung von Glukose und Albumin im Urin erfolgte im Labor Dr. M. Gerl.

Zur Bestimmung des Albumins wurde der Testkit „Mikrofluoral“ (Firma Progen Biotechnik, Heidelberg), ein Fluoreszenz-Test zur quantitativen Bestimmung von Mikroalbumin im Urin, verwendet.

Die Messung erfolgte im „Fluoreszenz Microplate Reader“ der Firma Progen Biotechnik, Heidelberg.

Zur Glukosebestimmung wurde der Testkit „Gluco-quant“ (Firma Roche Diagnostics, Mannheim), ein enzymatischer in vitro-Test zur quantitativen Bestimmung von Glukose im Urin, verwendet. Die Messung erfolgte im „Roche / Hitachi 912“-Analyzer der Firma Hoffmann- La Roche, Mannheim.

### **II.6 Bestimmung der Stoffwechselfparameter in Leber und Skelettmuskel**

Unmittelbar nach der Tötung am Versuchsende wurde der Bauchraum der Ratte mit einer chirurgischen Schere großflächig eröffnet. Ein etwa 1g schweres Leberstück wurde mit Hilfe einer anatomischen Pinzette und der chirurgischen Schere abgeschnitten und sofort in flüssigem Stickstoff (-196°C) schockgefroren.

Ebenso wurde mit dem Skelettmuskel verfahren. Das rechte Hinterbein wurde enthäutet, die Unterhaut- und Muskel-Faszien wurden mit einem Skalpell durchtrennt. Es wurde ein etwa 1g schweres Stück aus dem M. Gastrocnemius herausgeschnitten und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Gewebeproben von Leber und Muskel wurden dann bei -20°C tiefgefroren aufbewahrt.

Nach Beendigung der Studien wurden in einem pharmakologischen Labor der DG „Metabolic Diseases“ der Aventis Pharma Deutschland GmbH unter der Leitung von Dr. H.-L. Schäfer der Triglyzerid- und der Total-Cholesterin-Gehalt bestimmt.

Die Leber- und Muskelproben wurden bei Zimmertemperatur aufgearbeitet. In Reagenzgläser wurden Aliquots von 500 bis 700mg eingewogen und mit einer modifizierten Methode nach Bligh und Deyer

(1959) extrahiert. Jeder Probe wurden 5ml Extraktionsgemisch (Dichlormethan [Firma Merck, Darmstadt] : Methanol [Firma Riedel-de Haen, Seelze] 2:1) zugesetzt. Anschließend wurden die Proben 48h stehen gelassen. Nach der Inkubation wurde in 2 Schritten durch Zentrifugation („Varifuge 3.2 RS“, Firma Heraeus Med, Hanau) bei 3000 Umdrehungen/Minute die Phasentrennung herbeigeführt. Der Rückstand wurde dann mit Dichlormethan auf ein konstantes Volumen aufgefüllt, im Wasserbad abgedampft, mit 2-Propanol („Chromasolv“ der Firma Riedel-de Haen, Seelze) versetzt und in einem Cobas Mira Analyzer („Cobas Mira Plus“, Firma Hoffmann-La Roche, Mannheim) mit enzymatischen in vitro-Tests gemessen („TG GPO-PAP“ und „Cholesterin CHOD-PAP“, beide Testkits der Firma Roche Diagnostics, Mannheim).

### **II.7 Mikroskopische Untersuchung des M. Soleus**

Der M. Soleus der linken Hintergliedmaße wurde mikroskopisch auf das Vorkommen von IMCL untersucht.

Am eingebetteten Muskel ist eine Differenzierung zwischen intramyozellulärem Lipid und den zwischen den Muskelfasern liegenden Fettdepots (Pan et al., 1997; He et al., 2001; Levin et al., 2001) möglich. Während man IMCL im Zytoplasma der Muskelzellen als kugelförmige Tröpfchen in unmittelbarer Nähe der Mitochondrien zwischen den Myofibrillen findet, liegt EMCL in Adipozyten längs der Skelettmuskelzellen.

Für die Beurteilung des IMCL wurde der M. Soleus als oxidativer, mitochondrienreicher „slow-twitch“ Typ I-Muskel (84% Typ I-Fasern) ausgewählt (Schmalbruch, 1971; Song et al., 1999).



Unmittelbar nach der Tötung der Tiere und der Schockgefrierung von Leber- und Muskelproben wurde ein Hautschnitt am linken Hinterbein durchgeführt. Das Fell wurde abgezogen, die Unterhaut- und Muskel-Faszien wurden mit dem Skalpell durchtrennt. Dann wurde mit Hilfe einer anatomischen Pinzette der linke M. Soleus aus der Tiefe der Unterschenkelmuskulatur hervorgeholt und mit einer Schere herausgenommen (Hebel & Stromberg, 1986). Er wurde sofort in Karnovsky-Fixativ gelegt und bei +8°C bis zum Zuschnitt aufbewahrt.

Das Karnovsky-Fixativ bestand aus 2.5% Glutaraldehyd und 2% Formaldehyd in einem 0.1Molaren Phosphatpuffer. Dieser setzte sich zusammen aus 23 Teilen Kaliumdihydrogenphosphat (Lösung A) und aus 77 Teilen Natriumhydrogenphosphat (Lösung B); die Lösung hatte einen pH-Wert von 7.3.

Die weitere Fixierung, Entwässerung, Einbettung, Färbung und Untersuchung der Muskelproben erfolgte in einem Elektronenmikroskopie-Labor der Toxikologie/Pathologie der Gruppe „Drug Safety Evaluation“, Abteilung „LO“ der Aventis Pharma Deutschland GmbH unter der Leitung von Frau Dr. M. Stolte.

### *II.7.1 Lichtmikroskopie*

Von dem mit der Karnovsky-Lösung fixierten Muskel wurden etwa 2mm lange Stücke zugeschnitten, die über Nacht in einem Phosphatpuffer (s.o.) aufbewahrt wurden. Dann durchliefen die Muskelproben über etwa 16h eine Entwässerungsreihe (Phosphatpuffer, 1.25%iges Osmiumtetroxid [Firma Roth, Karlsruhe], Phosphatpuffer, aufsteigende Alkoholreihe 50 – 100%ig [Ethanol; Firma Riedel-de Haen, Seelze], Propylenoxid, Propylen-Epon 2:1, Propylen-Epon 1:1,

Propylen-Epon 1:2, Epon [Epoxidharz „Epon 100“; Firma Serva, Heidelberg]) in einem Microscopy Tissue Processor (Firma Lynx Inc., San Jose, USA).

Am Ende der Entwässerungsreihe wurden die Proben in Kunststoff (Glycidether der Firma Serva, Heidelberg) eingebettet. Dazu wurden die Muskelproben längs in mit Glycidether gefüllte Kautschukformen gelegt und 48h lang in einem Trockenschrank (Firma Heraeus Med, Hanau) bei 58°C polymerisiert.

Pro Muskel wurden 10 Blöcke eingebettet. Von diesen wurden 3 willkürlich ausgewählte Blöcke mit einer Diamantfräse („Ultratrim“, Cambridge Instruments, Firma CRA Inc., McLean, USA) auf die Probengröße gefräst, um Semidünnschnitte anfertigen zu können.

Anschließend wurden mit einem Mikrotom (Firma Leica, Wetzlar) unter Verwendung eines Glasmessers etwa 0.8µm dicke Semidünnschnitte geschnitten. Je Block wurden 3-4 Schnitte angefertigt. Die im Wassertrog des Glasmessers schwimmenden Schnitte wurden dann mit Hilfe eines Glasstabes auf einen entfetteten Objektträger überführt und auf einer Wärmeplatte bei 90°C 30min. lang getrocknet. Zur Färbung wurde eine alkalische Farbstofflösung („Azur II“) verwendet, die nach ca. einminütiger Einwirkzeit mit Aqua dest. abgespült wurde. Die Schnitte wurden mit einem xylolhaltigen Eindeckmittel („Entellan“ der Firma Merck, Darmstadt) eingedeckelt. Die Semidünnschnitte wurden dann lichtmikroskopisch (Lichtmikroskop „Olympus BH-2“, Firma Olympus, Hamburg) untersucht. Der Nachweis von IMCL erfolgte semiquantitativ bei 100-facher Vergrößerung (Ölimmersion).

Für die ultrastrukturelle Untersuchung wurde lichtmikroskopisch ein bestimmtes Gebiet ausgesucht.

### *II.7.2 Elektronenmikroskopie*

Das lichtmikroskopisch ausgewählte Areal wurde im Block mit einer Rasierklinge zugeschnitten. Dann wurden mit einem Mikrotom unter Verwendung eines Diamantmessers Ultradünnschnitte (60-80nm Dicke, etwa 10 Dünnschnitte pro Block) angefertigt und auf Kupfernetze (Plano GmbH, Wetzlar; 3mm Durchmesser, 100 Maschen pro Netz, 3 Schnitte auf einem Netz) gezogen. Die Kontrastierung mit Uranylacetat und Bleicitrat wurde im „Ultrastain“ (Firma Leica, Wetzlar) durchgeführt. Die kontrastierten Ultradünnschnitte wurden dann mit einem Transmissionselektronenmikroskop („Philips CM 100“, Firma Fei, Eindhoven, Niederlande) bei einer Hochspannung von 80kV untersucht.

Die Auswertung wurde bei 2.000- bis 25.000-facher Vergrößerung semiquantitativ durchgeführt.

### **II.8 Magnetresonanzspektroskopische Untersuchung des M. Soleus und des M. Tibialis Anterior**

Im Rahmen der Studien wurden bei einem Teil der Tiere in regelmäßigen Abständen magnetresonanzspektroskopische Messungen in einem Labor der Gruppe „Magnetic Resonance Imaging“, Abteilung „LO“ der Aventis Pharma Deutschland GmbH unter der Leitung von PD Dr. H.-P. Juretschke und Frau Dr. C. Neumann-Haefelin durchgeführt. Auch am Tag vor dem Glukose-Clamp-Versuch wurden die Ratten mittels Magnetresonanzspektroskopie (MRS) untersucht.

Die MRS kann als nicht-invasive Methode dazu benutzt werden, Stoffwechselvorgänge eines lebenden Organismus in vivo zu bestimmen. Biochemische Informationen werden in Form sogenannter „Spektren“ gewonnen. Da die Spektren volumenselektiv gemessen

werden, kann der Stoffwechsel in einem ganz bestimmten Bereich eines Organs beobachtet werden.

Die MRS bietet sich daher an, um in vivo Befunde zu erheben, die als Ergänzung der Daten von etablierten, zum Teil nicht-volumenselektiven Methoden dienen können.

Die  $^1\text{H}$ -MR-Spektroskopie bietet die Möglichkeit zur nicht-invasiven Bestimmung der muskulären Lipide mit Differenzierung der Anteile von IMCL und dem Fett in den Adipozyten (Schick et al., 1993; Brechtel et al., 1999). Die Protonen-Signale, die man von den Fettsäureketten der Triglyzeride erhält, stellen Signale der Methylengruppen dar.

Am Menschen wurde gezeigt, dass das IMCL mit der funktionellen Insulinsensitivität korreliert (Brechtel et al., 1999; Jacob et al., 1999; Krssak et al., 1999; Perseghin et al., 1999). Daher war ein Ziel dieser Arbeit, den IMCL-Gehalt im Rattenmuskel, gemessen mittels MRS, mit der Ganzkörper-Insulinsensitivität zu korrelieren.

Im Rahmen der durchgeführten Studien wurden die Tiere für die MRS-Untersuchung über eine Narkosemaske mit 4 Vol.% Isofluran und einem 1:2  $\text{O}_2:\text{N}_2\text{O}$ -Gemisch in einem halboffenen Narkose-System („Titus NMR“, Firma Dräger, Lübeck) mit Anästhesie-Monitoring narkotisiert. Sie wurden dann auf einem Heizkissen in einem Plexiglashalter fixiert. Ihre Körperinnentemperatur wurde während der Messungen bei  $37.2^\circ\text{C}$  gehalten.

Die MRS-Studien wurden mit einem 7 Tesla Bruker Biospec System (Firma Bruker Medical, Ettlingen) durchgeführt. Die Hochfrequenz-Anregung erfolgte mittels Resonator, die Signaldetektion mittels Oberflächenspule.  $^1\text{H}$ -MRS-Spektren wurden mittels einer volumen-selektiven PRESS-Sequenz (= Point-Resolved Volume Selective Spectroscopy) gemessen (Franke, 1998). Ein Bereich innerhalb des Muskels wurde ausgewählt (das sogenannte „volume of interest“), dort wurde das Voxel (= volume pixel; quaderförmiges Volumenelement) positioniert und das Spektrum aufgenommen.

Folgende Messparameter wurden verwendet: Echozeit  $\text{TE}=17\text{msec}$ , Repetitionszeit  $\text{TR}=1\text{sec}$ , Wasserunterdrückung mittels dreier CHESS-Pulse (= Chemical Shift Selective), 1024 Akquisitionen.

Der Muskel wurde parallel zum Magnetfeld  $B_0$  ausgerichtet, um eine Orientierung der Muskelfasern entlang des Magnetfeldes sicherzustellen. Die Voxel mit einer Kantenlänge von etwa 2mm wurden sowohl im M. Soleus als auch im M. Tibialis Anterior des linken Hinterbeines plaziert.

Dabei wurde darauf geachtet, das Voxel jeweils zentral im homogen erscheinenden Muskelgewebe zu positionieren, um störende Signale aus angrenzenden Muskeln, Blutgefäßen, Fett- oder Bindegewebssepten zu vermeiden.

Die beiden Muskeln wurden in Anlehnung an bereits veröffentlichte Studien ausgewählt; der M. Soleus ist ein oxidativer, mitochondrienreicher „slow-twitch“ Typ I-Muskel, der M. Tibialis Anterior ist ein glykolytischer „fast-twitch“ Typ IIa-Muskel (Schmalbruch, 1971; Armstrong & Phelps, 1984; Song et al., 1999).

Im Rahmen der Rosiglitazon-Studie an den Zucker Fatty Ratten (vgl. II.2.3) wurde die magnetresonanzspektroskopische IMCL-Messung im Soleusmuskel am isolierten Bein durchgeführt.

Hierfür wurde nach dem Töten der Ratte am Ende des Glukose-Clamp-Versuchs die rechte Hintergliedmaße vom Tierkörper abgesetzt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Einige Tage später wurde das Bein aufgetaut, Haut und Fett wurden abpräpariert. Dann wurde die mit Parafilm (Firma American National Can, Greenwich, USA) umhüllte Gliedmaße auf einer Plexiglasvorrichtung fixiert und im Magneten positioniert.

Die MRS-Studien wurden mit dem oben beschriebenen Bruker Biospec System durchgeführt. Es wurden identische Messparameter verwendet.

Diese ex vivo Untersuchungen am isolierten Muskel wurden sehr früh zu Beginn der experimentellen Arbeiten dieser Dissertation durchgeführt. Sie ergaben keine verwertbaren Ergebnisse.

Im Skelettmuskel setzt unmittelbar post mortem die Laktatbildung ein. Laktat wird als Stoffwechselmetabolit im Muskel angehäuft; innerhalb von 3h nach Eintritt des Todes hat sich die Laktatkonzentration verdreifacht (Moesgaard et al., 1995; Ntziachristos et al., 1997).

Bei der  $^1\text{H}$ -MRS-Messung stellt sich das Laktat mit 2 Signalanteilen dar; ein dominantes Signal erscheint bei etwa 1.4ppm, ein schwächeres bei etwa 4.1ppm (Asllani et al., 1999).

Das 1.4ppm-Signal interferiert nun mit dem Signal des intramyozellulären Lipids, welches an derselben Stelle erscheint. Diese Überlagerung der unterschiedlichen Signale post mortem verhindert eine klare Identifizierung und Bestimmung des IMCL.

### II.9 Auswertung

#### II.9.1 Berechnung der Glukose-Infusionsrate

Anhand der Menge an 15%iger Glukose, die im Rahmen des Glukose-Clamp-Versuch infundiert werden musste, um den Plasma-Glukose-Spiegel bei 5mmol/l zu halten, wurde die Glukose-Infusions-Rate (GIR) für den jeweiligen Messzeitpunkt ermittelt.

**GIR [mg/kg/min]** = ( Pumprate [ $\mu\text{l} \times \text{min}^{-1}$ ]  $\times$  Konzentration der Glukoselösung [ $\text{mg} \times \mu\text{l}^{-1}$ ]  $\times$  1000 )  $\times$  Körpergewicht der Ratte [ $\text{g}$ ] $^{-1}$

Jedem Zeitpunkt t (0., 5., 10., 15., .... 240.min) konnte so ein GIR-Wert zugeordnet werden. Aus den 13 Einzelwerten der Zeiträume t=60-120 min. sowie t=180-240 min. wurde jeweils der arithmetische Mittelwert  $\pm$  mittlerer Fehler des Mittelwerts (SEM) ermittelt. Dieser entsprach dann der mittleren GIR der zwei Insulin-Infusions-Stufen.

Die Steady-State-Blutglukose wurde aus den 13 Einzelwerten der Zeiträume t=60-120 min. sowie t=180-240 min. berechnet und als arithmetischer Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben.

Die mittlere GIR stellt unter Steady-State-Blutglukose-Bedingungen (im Mittel etwa 5mmol/l) ein Maß für die Ganzkörper-Insulinsensitivität dar. Diese setzt sich zusammen aus der muskulären Glukose-Utilisation und der Suppression der HGP.

Statistische Vergleiche wurden mit gepaartem oder nicht gepaartem, zweiseitigem t-Test durchgeführt. Ein p-Wert  $< 0.05$  wurde als statistisch signifikant angesehen.

Zur Durchführung der Berechnungen wurde das Software-Programm „Excel“ (Firma Microsoft, Redmond, USA) benutzt.

### *II.9.2 Mikroskopische IMCL-Messung*

Die Bestimmung des IMCL erfolgte semiquantitativ mittels visueller Evaluation der Semidünn- und der Dünnschnitte.

### *II.9.3 Magnetresonanzspektroskopische IMCL-Messung*

Die Auswertung der Einzelspektren erfolgte mit Hilfe des Software-Programms „MRUI 97.2“ (ein Gemeinschaftsprojekt mehrerer europäischer Universitäten, verantwortlich sind die Katholieke Universiteit Leuven, Belgien, und die Technische Universiteit Delft, Niederlande).

Nach der Fouriertransformation wurden die mit einer Lorenzfunktion gefilterten Signale einer Phasenkorrektur unterzogen („gefittet“). Die Signalintensitäten wurden durch Integration in festen Integrationsgrenzen möglichst objektiv bestimmt.

Zur Quantifizierung der Lipidsignale wurde das Integral des IMCL-Signals bezogen auf das Integral des Gesamtkreatin-Signals. Der so gewonnene Quotient des Integrals (IMCL/tCr) wurde für die Einzeltiere ermittelt und dann für die verschiedenen Gruppen gemittelt (arithmetischer Mittelwert  $\pm$  SEM).



### III Ergebnisse

#### III.1 Insulinresistenz bei verschiedenen Rattenstämmen

##### III.1.1 Physiologische Parameter

Die drei untersuchten Rattenstämme, die als Modelle für Insulinsensitivität (Wistar Ratten), Insulinresistenz (Zucker Fatty Ratten) und Typ II Diabetes (Zucker Diabetic Fatty Ratten) dienen, unterschieden sich im mittleren Körpergewicht und zum Teil auch im Alter voneinander (*Tabelle III-1*). Die im Glukose-Clamp-Versuch untersuchten Zucker Fatty (ZF) und die Zucker Diabetic Fatty (ZDF) Ratten waren gleich alt, wohingegen die Wistar Ratten vier Wochen jünger waren. Der Gewichtsunterschied zwischen den ZF und den ZDF Ratten einer Altersgruppe war signifikant. Die einen Monat jüngeren Wistar Ratten unterschieden sich im Gewicht signifikant von den ZF und von den ZDF Ratten.

Die untersuchten ZF Ratten dienten gleichzeitig als Kontrolltiere für die Rosiglitazon-Studie (siehe III.3).

<b>Tierstamm</b>	<b>Zahl (n)</b>	<b>Alter (Wo.)</b>	<b>Gewicht (g)</b>
Wistar	8	10-12	278 ± 16
Zucker Fatty	8	14-16	563 ± 13 *
Zucker Diabetic Fatty	8	14-16	343 ± 17 *†

***Tabelle III-1 Versuchstierdaten der verwendeten Rattenstämme. Das Körpergewicht ist als Mittelwert ± SEM angegeben. \*  $p < 0.05$  vs. Wistar; †  $p < 0.05$  vs. Zucker Fatty.***

### *III.1.2 Stoffwechselparameter im Plasma*

Die Insulin- und die Lipidstoffwechselparameter, die während des Glukose-Clamp-Versuchs zu den drei Zeitpunkten  $t=0h$  (basal),  $t=2h$  (nach der ersten Insulin-Infusionsstufe) und  $t=4h$  (nach der zweiten Insulin-Infusionsstufe) bestimmt wurden (vgl. *Abb.II-2*), unterschieden sich bei den verschiedenen Rattenstämmen deutlich voneinander (*Tabelle III-2*).

Signifikante Unterschiede traten zu jedem Zeitpunkt der Bestimmung zwischen den Plasma-Triglyzeridspiegeln der Wistar Ratten, die deutlich niedriger lagen, und denen der ZF bzw. ZDF Ratten auf. Die Plasma-Triglyzeridspiegel der ZF und der ZDF Ratten waren in etwa gleich hoch und blieben im Verlauf des Glukose-Clamp-Versuchs annähernd konstant, während die der Wistar Ratten kontinuierlich abnahmen.

Hinsichtlich der Glyzerolspiegel waren die Unterschiede bei jeder der 3 Bestimmungen zwischen allen Gruppen signifikant.

Signifikante Unterschiede wurden bei der Bestimmung des Plasma-Total-Cholesterins zu allen 3 Zeitpunkten zwischen allen Gruppen beobachtet; nur die Plasma-Cholesterin-Konzentration der ZF und die der ZDF Ratten zum Zeitpunkt  $t=4h$  zeigten keinen signifikanten Unterschied.

<b>Tierstamm</b>	<b>Insulin-Inf. (mU/kg/min)</b>	<b>TG (mmol/l)</b>	<b>Glyzerol (<math>\mu</math>mol/l)</b>	<b>T-Chol. (mmol/l)</b>
Wistar	0	$0.32 \pm 0.1$	$64 \pm 4$	$1.41 \pm 0.1$
	4.8	$0.14 \pm 0.1$	$19 \pm 3$	$1.09 \pm 0.1$
	9.6	$0.08 \pm 0.1$	$14 \pm 3$	$0.78 \pm 0.1$
ZF	0	$3.86 \pm 0.4 *$	$324 \pm 21 *$	$2.49 \pm 0.1 *$
	4.8	$4.03 \pm 0.6 *$	$292 \pm 38 *$	$2.32 \pm 0.2 *$
	9.6	$3.51 \pm 0.6 *$	$235 \pm 27 *$	$3.51 \pm 0.6 *$
ZDF	0	$3.44 \pm 0.3 *$	$95 \pm 7 *†$	$4.02 \pm 0.1 *†$
	4.8	$3.16 \pm 0.3 *$	$56 \pm 11 *†$	$3.76 \pm 0.1 *†$
	9.6	$3.70 \pm 0.3 *$	$54 \pm 15 *†$	$3.34 \pm 0.1 *$

***Tabelle III-2 Lipidstoffwechselparameter der verschiedenen Rattenstämme während des Glukose-Clamp-Versuchs. Mittelwerte  $\pm$  SEM bei n=8. \*  $p < 0.05$  vs. Wistar; †  $p < 0.05$  vs. ZF.***

Signifikante Unterschiede hinsichtlich der Plasma-Insulinspiegel traten zu jedem Zeitpunkt der Bestimmung zwischen den Wistar und den ZF Ratten auf (*Tabelle III-3*). Die Plasma-Insulinspiegel der ZF und der ZDF Ratten unterschieden sich bis auf den Zeitpunkt t=0h nicht signifikant; tendenziell lagen die der ZF Ratten höher. Die ZDF Ratten wiesen im Vergleich zu den Wistar Ratten der Tendenz nach höhere Plasma-Insulinkonzentrationen auf. Aufgrund der großen Streubreite innerhalb der ZDF-Gruppe waren nur die Plasma-Insulinspiegel zu den Zeitpunkten t=2h und t=4h signifikant erhöht.

Hinsichtlich der Leptinspiegel waren die Unterschiede zu jedem Zeitpunkt zwischen allen Gruppen signifikant, wobei die ZF Ratten die höchsten Leptinwerte im Plasma aufwiesen (*Tabelle III-3*).

<b>Tierstamm</b>	<b>Insulin-Inf. (mU/kg/min)</b>	<b>Insulin (ng/ml)</b>	<b>Leptin (ng/ml)</b>
Wistar	0	1.3 ± 0.4	0.7 ± 0.4
	4.8	4.0 ± 0.8	2.6 ± 0.8
	9.6	4.6 ± 1.0	3.2 ± 0.2
ZF	0	7.2 ± 0.8 *	71 ± 10 *
	4.8	19.0 ± 4.9 *	107 ± 21 *
	9.6	24.8 ± 3.4 *	166 ± 37 *
ZDF	0	4.0 ± 1.3 †	23 ± 4 *†
	4.8	12.9 ± 2.7 *	56 ± 9 *†
	9.6	19.1 ± 6.4 *	70 ± 15 *†

***Tabelle III-3 Plasma-Insulin- und Leptinspiegel der verschiedenen Rattenstämme während des Glukose-Clamp-Versuchs. Mittelwerte ± SEM bei n=8. \*  $p < 0.05$  vs. Wistar; †  $p < 0.05$  vs. ZF.***

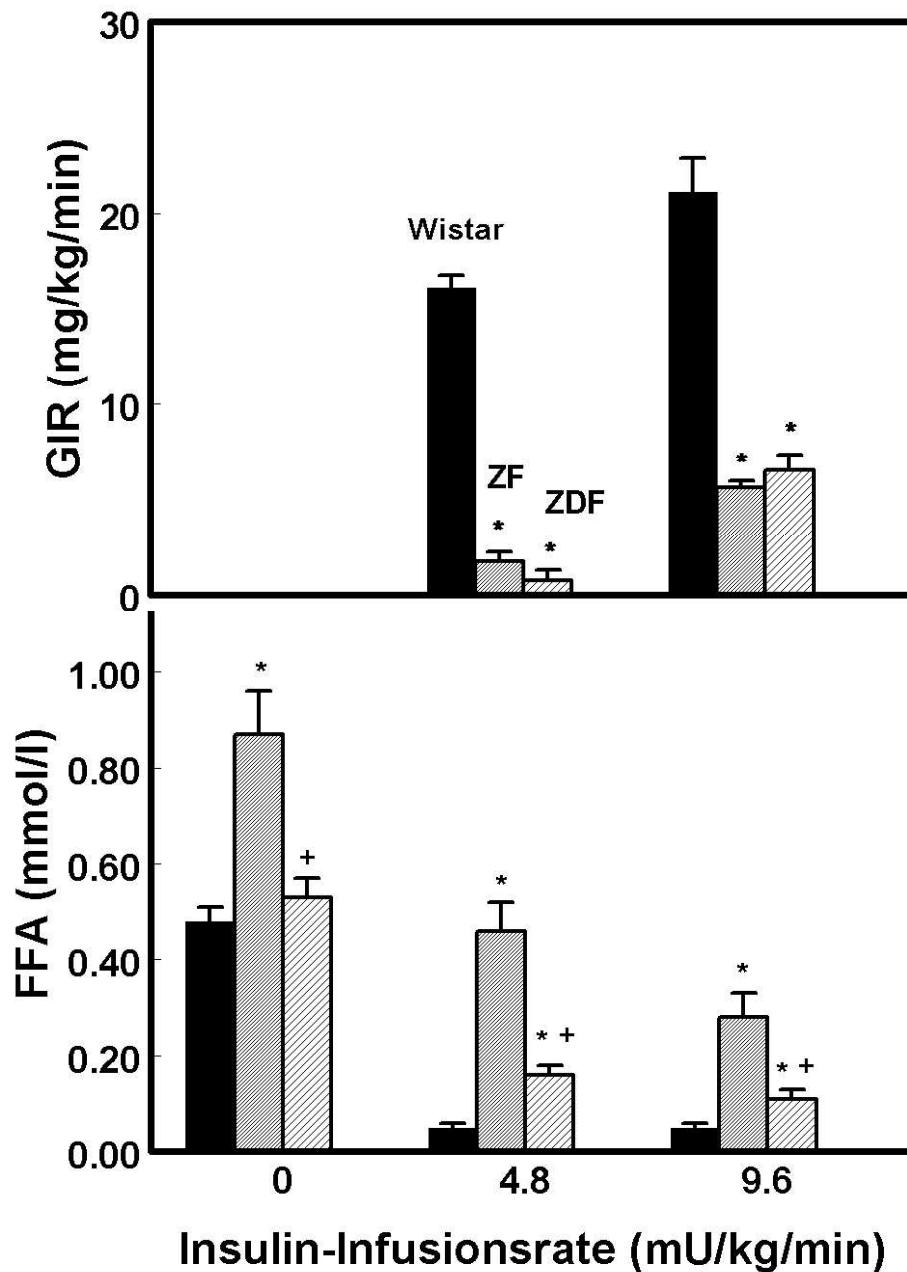
### *III.1.3 Glukose-Infusionsrate und freie Fettsäuren als Parameter der Insulinsensitivität*

Im Vergleich zu den Wistar Ratten, die als insulinsensitive Kontrollen untersucht wurden, zeigten die ZF und die ZDF Ratten im Glukose-Clamp-Versuch deutlich niedrigere Glukose-Infusionsraten und deutlich erhöhte Spiegel freier Fettsäuren als Indikatoren peripherer Insulinresistenz (*Abb.III-1*).

Eine signifikant verminderte Glukose-Infusionsrate (GIR) bei beiden Insulin-Infusionsstufen (4.8 sowie 9.6 mU/kg/min) wurde sowohl bei den ZF als auch bei den ZDF Ratten gegenüber den Wistar Ratten beobachtet.

Die Plasmaspiegel freier Fettsäuren (FFA) waren bei den ZF Ratten sowohl basal als auch nach beiden Insulin-Infusionsstufen im Vergleich zu den Wistar Ratten und zu den ZDF Ratten signifikant erhöht. Die Plasmaspiegel freier Fettsäuren glichen bei den Wistar Ratten basal denen der ZDF Ratten; nach den beiden Insulin-Infusionsstufen lagen sie bei den Wistar Ratten aber signifikant niedriger.

## Glukose-Infusionsrate und Plasmaspiegel freier Fettsäuren während des Glukose-Clamp-Versuchs



**Abb.III-1** Glukose-Infusionsrate und Plasmaspiegel freier Fettsäuren der Wistar, ZF und ZDF Ratten basal sowie während Insulin-Infusion (4.8 und 9.6mU/kg/min) unter Steady State-Bedingungen (Blutglukose 4-5mmol/l). Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM bei n=8. \*  $p < 0.05$  vs. Wistar; +  $p < 0.05$  vs. ZF.

## III.2 Fruktose-Fütterung von Wistar Ratten

### III.2.1 Physiologische Parameter

Die über einen Zeitraum von 8 Wochen mit Fruktose-Futter beziehungsweise einer Kontrolldiät gefütterten männlichen Wistar Ratten wurden im Alter von 16 Wochen im Glukose-Clamp-Versuch auf ihre Insulinsensitivität untersucht.

Das Körpergewicht der Tiere lag am Ende der achtwöchigen Fütterung bei  $388 \pm 7$  g (Kontrollen) bzw. bei  $389 \pm 8$  g (Fruktose-Tiere). Die mittlere Körpergewichtszunahme betrug  $158 \pm 5$  g bei den Kontrolltieren und  $163 \pm 6$  g bei den Fruktose-gefütterten Ratten (*Tabelle III-4*).

Es konnte kein signifikanter Unterschied in der mittleren Futteraufnahme pro Tag zwischen den Gruppen beobachtet werden.

Gruppe	Zahl (n)	Mittlere Futteraufnahme (g/Tag)	Gewicht (g)
Kontrolle	7	$24.1 \pm 0.7$	$388 \pm 7$
Fruktose-gefüttert	6	$25.2 \pm 0.5$	$389 \pm 8$

***Tabelle III-4 Versuchstierdaten der verwendeten Wistar Ratten am Ende der Studie. Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben.***

### III.2.2 Stoffwechselparameter im Plasma

Die Stoffwechselparameter, die nach fünfwöchiger Fütterung der Fruktose-Diät bei den gefütterten Tieren bestimmt wurden, unterschieden sich bei den Fruktose-gefütterten und den Kontroll-Ratten nicht signifikant voneinander (*Tabelle III-5*). Tendenziell aber waren sowohl die Blutglukose-Werte als auch die Triglyzerid-Spiegel bei den Fruktose-gefütterten Tieren erhöht.

<b>Gruppe</b>	<b>Glukose (mmol/l)</b>	<b>FFA (mmol/l)</b>	<b>TG (mmol/l)</b>	<b>T-Chol. (mmol/l)</b>
Kontrolle	6.18 ± 0.2	0.22 ± 0.1	3.87 ± 0.5	2.48 ± 0.2
Fruktose- gefüttert	6.61 ± 0.2	0.24 ± 0.1	4.82 ± 0.5	2.34 ± 0.1

***Tabelle III-5 Stoffwechselparameter der beiden Gruppen nach fünfwöchiger Fruktose-Diät (gefütterte Tiere). Mittelwerte ± SEM bei n=7 bzw. 6.***

Die Lipidstoffwechselparameter, die während des nach der achtwöchigen Fütterungsperiode durchgeführten Glukose-Clamp-Versuchs zu den drei Zeitpunkten t=0h (basal), t=2h (nach der ersten Insulin-Infusionsrate) und t=4h (nach der zweiten Insulin-Infusionsrate) bestimmt wurden (vgl. *Abb.II-2*), unterschieden sich bei den Fruktose-gefütterten und den Kontroll-Ratten nicht signifikant voneinander (*Tabelle III-6*). Hierbei waren die Tiere über Nacht gehungert. Damit könnten sich die vergleichsweise niedrigen Plasma-TG-Spiegel der Fruktose-Gruppe erklären lassen.



<b>Gruppe</b>	<b>Insulin-Inf. (mU/kg/min)</b>	<b>TG (mmol/l)</b>	<b>Glyzerol (<math>\mu</math>mol/l)</b>	<b>T-Chol. (mmol/l)</b>
Kontrolle	0	0.32 $\pm$ 0.1	106 $\pm$ 8	1.40 $\pm$ 0.2
	2.4	0.35 $\pm$ 0.1	62 $\pm$ 13	1.24 $\pm$ 0.2
	4.8	0.28 $\pm$ 0.1	35 $\pm$ 7	1.09 $\pm$ 0.2
Fruktose- gefüttert	0	0.36 $\pm$ 0.1	91 $\pm$ 4	1.40 $\pm$ 0.1
	2.4	0.30 $\pm$ 0.1	51 $\pm$ 8	1.26 $\pm$ 0.1
	4.8	0.17 $\pm$ 0.1	29 $\pm$ 4	1.08 $\pm$ 0.1

***Tabelle III-6 Lipidstoffwechselfparameter der beiden Gruppen während des Glukose-Clamp-Versuchs (über Nacht gehungerte Tiere). Mittelwerte  $\pm$  SEM bei n=7 bzw. 6.***

Auch bei der Bestimmung der Plasma-Insulinspiegel zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll- und der Fruktose-Gruppe (Tabelle III-7).

<b>Gruppe</b>	<b>Insulin-Inf. (mU/kg/min)</b>	<b>Insulin (ng/ml)</b>
Kontrolle	0	1.6 $\pm$ 0.2
	2.4	3.3 $\pm$ 0.4
	4.8	3.5 $\pm$ 0.6
Fruktose- gefüttert	0	1.7 $\pm$ 0.1
	2.4	3.1 $\pm$ 0.2
	4.8	3.8 $\pm$ 1.0

***Tabelle III-7 Plasma-Insulinspiegel der beiden Gruppen während des Glukose-Clamp-Versuchs. Mittelwerte  $\pm$  SEM bei n=7 bzw. 6.***

### III.2.3 Stoffwechselparameter im Gewebe

Der Triglyzeridgehalt der Leber und der Skelettmuskulatur lag bei beiden Gruppen etwa gleich hoch (*Tabelle III-8*). Der Gesamtcholesteringehalt der Leber war bei den Fruktose-gefütterten Ratten im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant erhöht. Hinsichtlich des Gesamtcholesteringehalts im Skelettmuskel war kein Unterschied zwischen beiden Gruppen feststellbar.

<b>Gruppe</b>	<b>Leber-TG (mg/g)</b>	<b>Muskel-TG (mg/g)</b>	<b>Leber-T- Chol. (mg/g)</b>	<b>Muskel-T- Chol. (mg/g)</b>
Kontrolle	1.8 ± 0.5	3.9 ± 0.9	2.0 ± 0.1	0.5 ± 0.1
Fruktose- gefüttert	2.0 ± 0.3	3.7 ± 1.5	2.4 ± 0.2 *	0.5 ± 0.1

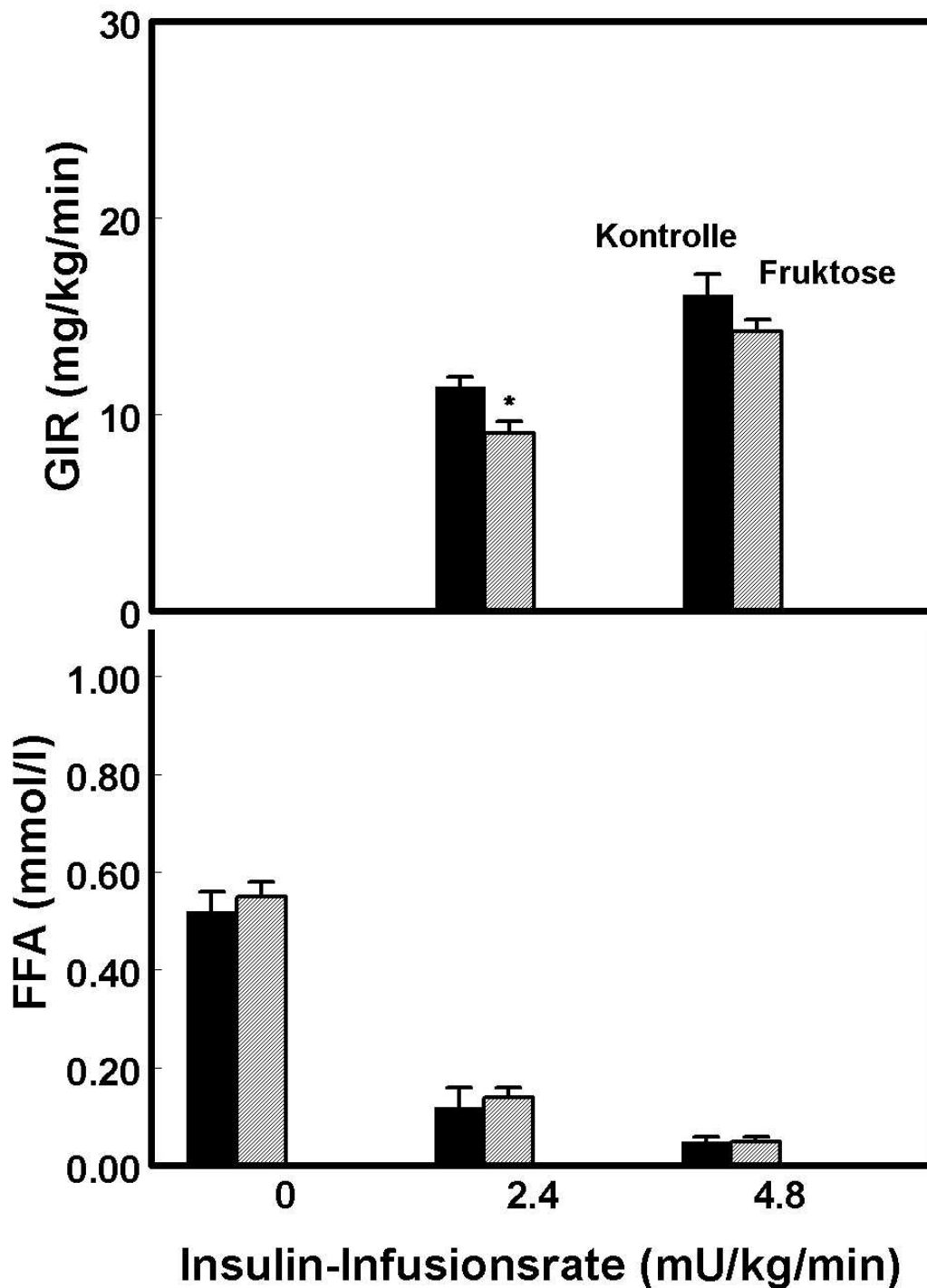
***Tabelle III-8 Triglyzerid- und Gesamtcholesteringehalt der Leber und der Skelettmuskulatur (in mg pro g Gewebe) der beiden Gruppen nach dem Glukose-Clamp-Versuch. Mittelwerte ± SEM bei n=7 bzw. 6.***

### III.2.4 Glukose-Infusionsrate und freie Fettsäuren als Parameter der Insulinsensitivität

Im Vergleich zu den insulinsensitiven Kontrolltieren wiesen die Fruktose-gefütterten Ratten im Glukose-Clamp-Versuch niedrigere Glukose-Infusionsraten auf (*Abb.III-2*).

Bei der 2.4 mU/kg/min-Insulin-Infusion lag die Glukose-Infusionsrate (GIR) bei den Fruktose-gefütterten Tieren signifikant niedriger als bei den Kontrollen, was auf eine verminderte Insulinempfindlichkeit schließen lässt. Die Plasmaspiegel freier Fettsäuren (FFA) hingegen unterschieden sich bei den Fruktose-gefütterten Ratten nicht von denen der Kontrolltiere (*Abb.III-2*).

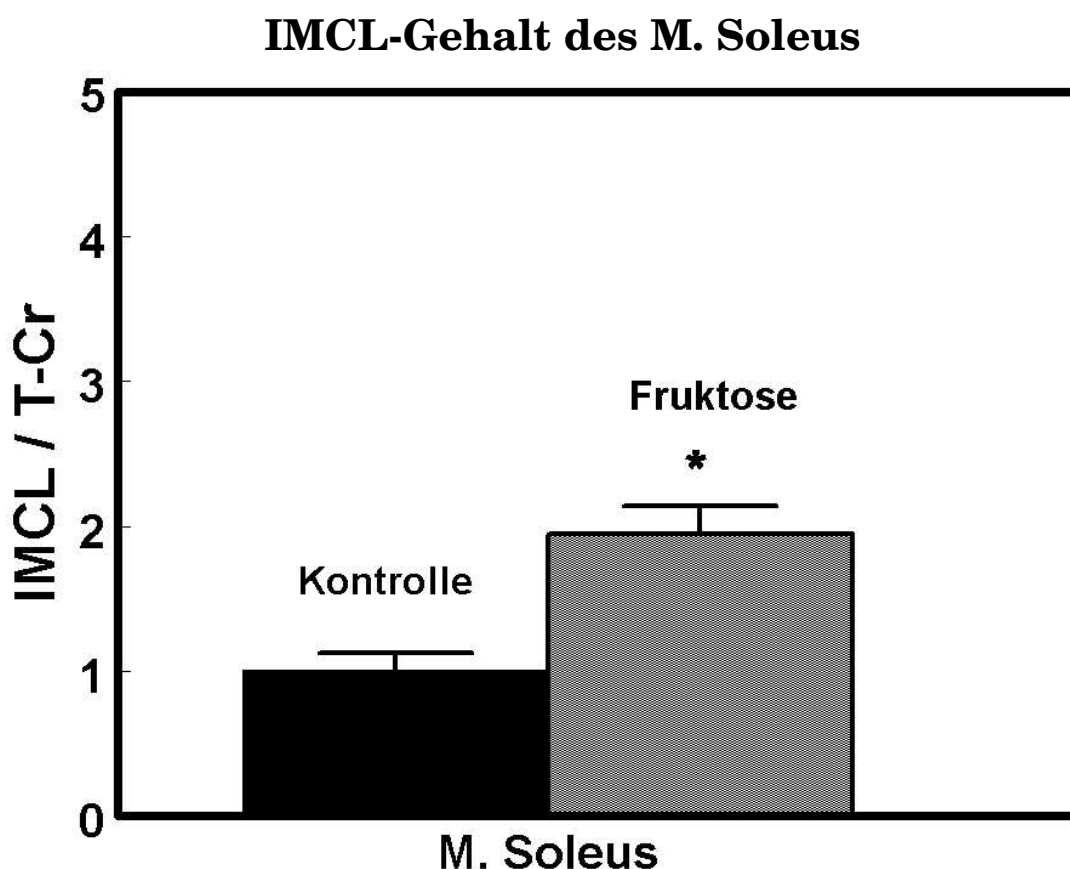
## Glukose-Infusionsrate und Plasmaspiegel freier Fettsäuren während des Glukose-Clamp-Versuchs



**Abb.III-2** Glukose-Infusionsrate und Plasmaspiegel freier Fettsäuren von Fructose-gefütterten Wistar Ratten und Kontrolltieren basal sowie während Insulin-Infusion (2.4 und 4.8mU/kg/min) unter Steady State-Bedingungen (Blutglukose 4-5mmol/l). Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM bei n=7 bzw. 6. \*  $p < 0.05$  vs. Kontrollen.

### III.2.5 IMCL-Bestimmung mittels MRS

Der am Vortag des Glukose-Clamp-Versuchs gemessene IMCL-Gehalt im Soleusmuskel der Fruktose-gefütterten Ratten war gegenüber dem der Kontrolltiere signifikant erhöht (Abb.III-3).



**Abb.III-3 Intramyozelluläres Lipid im M. Soleus von Fruktose-gefütterten Wistar Ratten und von Kontrolltieren, gemessen mittels MRS. Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM bei n=7 bzw. 6. \*  $p < 0.05$  vs. Kontrollen.**

Der signifikant erhöhte IMCL-Gehalt im M. Soleus der Fruktose-gefütterten Ratten korrespondierte mit der signifikant herabgesetzten Insulinempfindlichkeit dieser Tiere (bei der 2.4mU/kg/min-Insulin-Infusion).

### III.2.6 IMCL-Bestimmung mittels Mikroskopie

Die mikroskopische Untersuchung des M. Soleus ergab keinen Unterschied im IMCL-Gehalt zwischen den Fruktose- und den Kontrolltieren. Daraus lässt sich ableiten, dass bereits geringe Unterschiede in der IMCL-Menge ausreichend scheinen, um eine deutliche funktionelle Insulinresistenz im Glukose-Clamp-Versuch auszulösen; dieser Unterschied ist quantitativ jedoch offensichtlich zu gering, um mikroskopisch detektiert zu werden.

## III.3 Rosiglitazon-Behandlung von ZF Ratten

### III.3.1 Physiologische Parameter

Die über einen Zeitraum von 3 Wochen mit dem PPAR $\gamma$ -Agonisten Rosiglitazon behandelten männlichen Zucker Fatty Ratten sowie die entsprechenden Kontrolltiere wurden im Alter von 15 bis 16 Wochen im Glukose-Clamp-Versuch auf ihre Insulinsensitivität untersucht. Die Kontrolltiere wurden gleichzeitig für die vergleichende Studie der verschiedenen Rattenstämme verwendet (vgl. III.1).

Die Rosiglitazon-behandelten Tiere unterschieden sich im End-Körpergewicht deutlich von den Kontrolltieren (*Tabelle III-9*).

<b>Gruppe</b>	<b>Zahl (n)</b>	<b>Anfangs- Körpergewicht (g)</b>	<b>End- Körpergewicht (g)</b>
Kontrolle	8	527 $\pm$ 14	563 $\pm$ 13
Rosiglitazon	7	522 $\pm$ 18	598 $\pm$ 18

***Tabelle III-9 Körpergewichte der ZF Ratten vor und nach der Rosiglitazon-Studie. Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben.***

Die Rosiglitazon-Behandlung erhöhte bei den Ratten signifikant die Futter- und Wasseraufnahme sowie den Gewichtszuwachs (*Tabelle III-10*).

<b>Gruppe</b>	<b>Mittlere Futteraufnahme (g/Tag)</b>	<b>Mittlere Wasseraufnahme (g/Tag)</b>	<b>Mittlere Gewichtszunahme (g)</b>
Kontrolle	31 $\pm$ 0.6	27 $\pm$ 0.4	36 $\pm$ 6
Rosiglitazon	39 $\pm$ 0.9 *	49 $\pm$ 1.2 *	76 $\pm$ 5 *

***Tabelle III-10 Versuchstierdaten der ZF Ratten. Die mittlere Gewichtszunahme errechnet sich aus der Differenz zwischen Anfangs- und End-Körpergewicht. Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben. \*  $p < 0.05$  vs. Kontrollen.***

### *III.3.2 Stoffwechselparameter im Plasma*

Rosiglitazon senkte signifikant die Plasmaspiegel von Triglyzeriden, während das Gesamt-Cholesterin bei den behandelten Tieren signifikant anstieg (*Tabelle III-11*). Das Glyzerol war basal (t=0h) bei der Rosiglitazon-Gruppe ebenfalls signifikant erhöht, wohingegen es nach Insulingabe signifikant niedriger lag als bei den Kontrolltieren, da die Rosiglitazon-Behandlung die Wirkung des Insulins verbessert.

Die Verdoppelung der basalen Glyzerolspiegel lässt sich mit einer Rosiglitazon-vermittelten gesteigerten intravasalen Lipolyse durch Aktivierung der Lipoprotein Lipase (LPL) erklären. Auch die niedrigen Plasma-TG-Spiegel sind eine Folge der gesteigerten Lipolyse.

Gruppe	Insulin-Inf. (mU/kg/min)	TG (mmol/l)	Glyzerol ( $\mu$ mol/l)	T-Chol. (mmol/l)
Kontrolle	0	$3.88 \pm 0.4$	$324 \pm 21$	$2.49 \pm 0.1$
	4.8	$4.03 \pm 0.6$	$292 \pm 38$	$2.32 \pm 0.2$
	9.6	$3.51 \pm 0.6$	$235 \pm 27$	$2.09 \pm 0.2$
Rosiglitazon	0	$0.93 \pm 0.1 *$	$682 \pm 45 *$	$3.55 \pm 0.1 *$
	4.8	$0.26 \pm 0.1 *$	$109 \pm 11 *$	$3.03 \pm 0.1 *$
	9.6	$0.28 \pm 0.1 *$	$102 \pm 7 *$	$2.68 \pm 0.1 *$

***Tabelle III-11 Lipidstoffwechselparameter der unbehandelten (Kontrolle) und der Rosiglitazon-behandelten ZF Ratten (Rosiglitazon) während des Glukose-Clamp-Versuchs. Mittelwerte  $\pm$  SEM bei n=8 bzw. 7. \*  $p < 0.05$  vs. Kontrollen.***

Rosiglitazon senkte die basalen Plasma-Insulinspiegel signifikant (Tabelle III-12). Die Leptinspiegel hingegen lagen basal und nach der 4.8mU/kg/min-Insulin-Infusion bei den behandelten Tieren signifikant höher als bei den Kontrollen. Diese hohen Leptin-Werte könnten eine Folge der extremen Adipositas der Tiere sein.

Gruppe	Insulin-Inf. (mU/kg/min)	Insulin (ng/ml)	Leptin (ng/ml)
Kontrolle	0	7.2 ± 0.8	71 ± 10
	4.8	19.0 ± 3.9	107 ± 20
	9.6	24.8 ± 3.4	166 ± 37
Rosiglitazon	0	2.5 ± 0.1 *	115 ± 13 *
	4.8	13.7 ± 1.7	169 ± 18 *
	9.6	18.9 ± 3.0	222 ± 22

***Tabelle III-12 Plasma-Insulin- und Leptin-Spiegel der unbehandelten (Kontrolle) und der Rosiglitazon-behandelten ZF Ratten (Rosiglitazon) während des Glukose-Clamp-Versuchs. Mittelwerte ± SEM bei n=8 bzw. 7. \*  $p < 0.05$  vs. Kontrollen.***

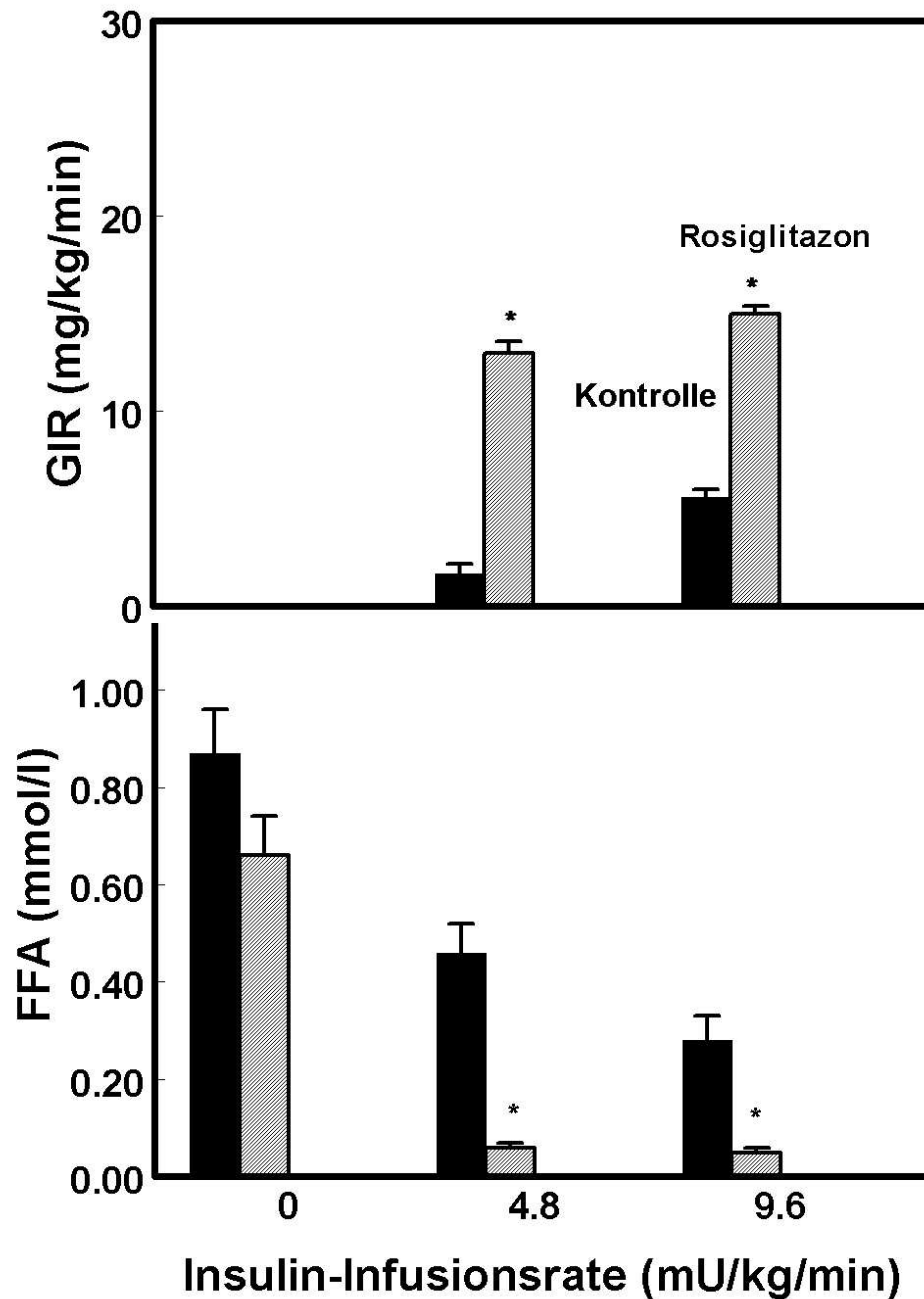
### *III.3.3 Glukose-Infusionsrate und freie Fettsäuren als Parameter der Insulinsensitivität*

Die dreiwöchige Rosiglitazon-Gabe führte im Glukose-Clamp-Versuch zu einer deutlichen Verbesserung der Insulinsensitivität. Die Glukose-Infusionsraten waren bei beiden Insulin-Infusionsstufen im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöht (*Abb.III-4*).

Auch die Plasmaspiegel freier Fettsäuren, die basal aufgrund der Rosiglitazon-Behandlung bereits erniedrigt waren, sanken während der Insulin-Infusion signifikant stärker ab (*Abb.III-4*). Rosiglitazon bewirkt somit eine ausgeprägte Dissoziation des physiologischerweise konstanten Verhältnisses FFA ↔ Glyzerol.



## Glukose-Infusionsrate und Plasmaspiegel freier Fettsäuren während des Glukose Clamp



**Abb.III-4** Glukose-Infusionsrate und Plasmaspiegel freier Fettsäuren von unbehandelten (Kontrolle) und Rosiglitazon-behandelten ZF Ratten (Rosiglitazon) basal sowie während Insulin-Infusion (4.8 und 9.6mU/kg/min) unter Steady State-Bedingungen (Blutglukose 4-5mmol/l). Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM bei n=8 bzw. 7. \*  $p < 0.05$  vs. Kontrollen.

### *III.3.4 IMCL-Bestimmung mittels MRS*

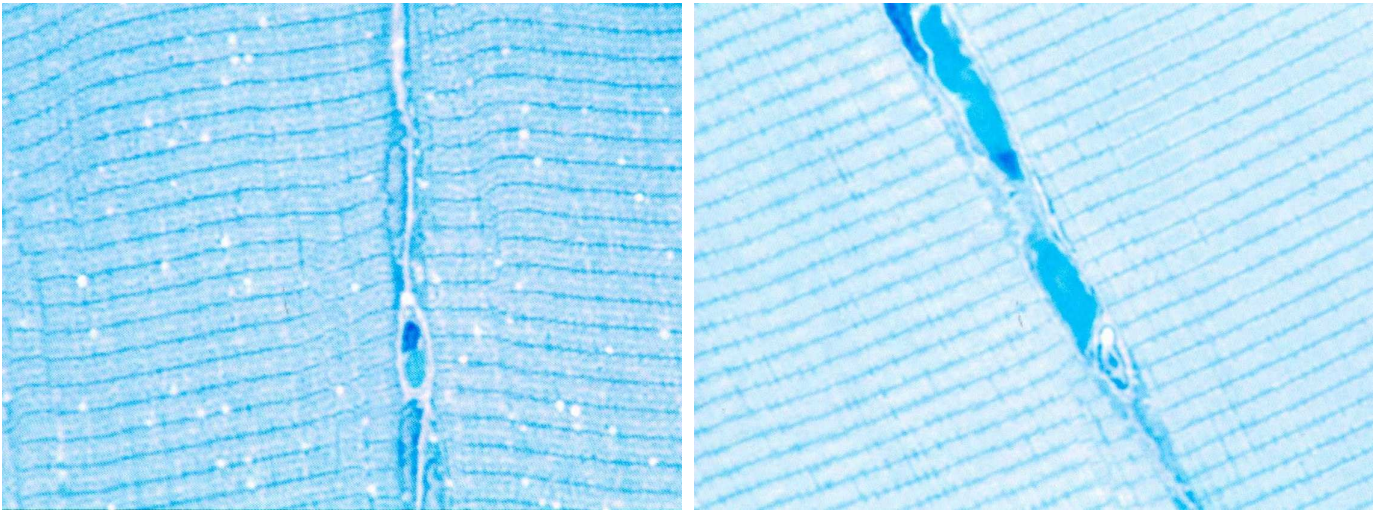
Die magnetresonanzspektroskopische IMCL-Messung im Soleusmuskel wurde im Anschluss an den Glukose-Clamp-Versuch am isolierten Bein durchgeführt. Sie ergab keine verwertbaren Ergebnisse.

Post mortem interferiert das Laktat-Signal mit dem Signal des intramyozellulären Lipids bei 1.4ppm, da beide an derselben Stelle erscheinen (vgl. II.8). Diese Überlagerung der unterschiedlichen Signale verhinderte eine klare Identifizierung und Bestimmung des IMCL.

### *III.3.5 IMCL-Bestimmung mittels Mikroskopie*

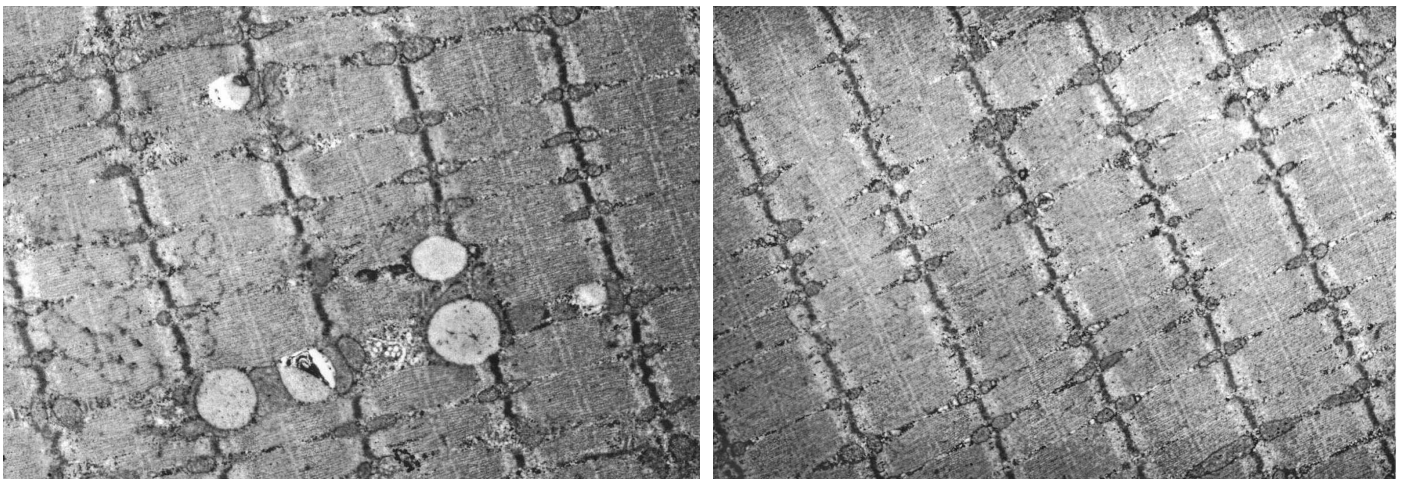
Die mikroskopische Untersuchung zeigte, dass im M. Soleus der Kontrolltiere IMCL vorhanden war, während die Muskelproben der Rosiglitazon-behandelten Ratten deutlich weniger bis gar kein IMCL aufwiesen. Dies war sowohl licht- (*Abb.III-5*) als auch elektronenmikroskopisch (*Abb.III-6*) nachweisbar.

## Lichtmikroskopischer Nachweis des IMCL



**Abb.III-5 Intramyozelluläres Lipid (IMCL) im Semi-Dünnschnitt bei 100-facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop. Die Kontrolltiere (links) weisen im M. Soleus IMCL in Form von Droplets auf, während bei den Rosiglitazon-behandelten ZF Ratten (rechts) kaum IMCL vorhanden ist.**

## Elektronenmikroskopischer Nachweis des IMCL



**Abb.III-6 Intramyozelluläres Lipid (IMCL) im Dünnschnitt bei 10.000-facher Vergrößerung im Elektronenmikroskop. Die Kontrolltiere (links) weisen im M. Soleus IMCL in Form von Droplets auf, während bei den Rosiglitazon-behandelten ZF Ratten (rechts) kaum IMCL vorhanden ist.**

Dieser deutlich verminderte IMCL-Gehalt im M. Soleus der Rosiglitazon-behandelten Ratten korrespondierte mit ihrer signifikant höheren Insulinsensitivität im Glukose-Clamp-Versuch.

### **III.4 Behandlung von ZF Ratten mit einem fettzellspezifischen und selektiven Adenosin-A<sub>1</sub>-Agonisten**

#### *III.4.1 Physiologische Parameter*

Nach akuter Behandlung mit dem fettzellspezifischen und selektiven Adenosin-A<sub>1</sub>-Agonisten ARA wurden 14 bis 16 Wochen alte männliche Zucker Fatty Ratten sowie entsprechende Kontrolltiere im Glukose-Clamp-Versuch auf ihre Insulinsensitivität untersucht (*Tabelle III-13*).

<b>Gruppe</b>	<b>Zahl (n)</b>	<b>Gewicht (g)</b>
Kontrolle	8	587 ± 16
ARA	8	611 ± 17

***Tabelle III-13 Versuchstierdaten der Zucker Fatty Ratten. Werte sind als Mittelwert ± SEM angegeben.***

#### *III.4.2 Stoffwechselparameter im Plasma*

Die akute Behandlung mit ARA senkte die Plasmaspiegel von Triglyzeriden und Glyzerol signifikant, während das Gesamt-Cholesterin unverändert blieb (*Tabelle III-14*).

Gruppe	Insulin-Inf. (mU/kg/min)	TG (mmol/l)	Glyzerol ( $\mu$ mol/l)	T-Chol. (mmol/l)
Kontrolle	0	3.34 $\pm$ 0.3	339 $\pm$ 14	2.87 $\pm$ 0.2
	4.8	3.55 $\pm$ 0.4	339 $\pm$ 25	2.69 $\pm$ 0.2
	9.6	3.25 $\pm$ 0.5	291 $\pm$ 27	2.36 $\pm$ 0.2
ARA	0	1.73 $\pm$ 0.3 *	87 $\pm$ 9 *	3.47 $\pm$ 0.3
	4.8	1.22 $\pm$ 0.2 *	80 $\pm$ 8 *	2.81 $\pm$ 0.9
	9.6	1.03 $\pm$ 0.2 *	86 $\pm$ 5*	2.30 $\pm$ 0.2

***Tabelle III-14 Lipidstoffwechselparameter der unbehandelten (Kontrolle) und der akut mit ARA behandelten ZF Ratten (ARA) während des Glukose-Clamp-Versuchs. Mittelwerte  $\pm$  SEM bei n=8. \*  $p < 0.05$  vs. Kontrollen.***

ARA senkte die basalen Plasma-Insulinspiegel signifikant (*Tabelle III-15*). Die Leptinspiegel waren bei den behandelten Tieren basal tendenziell und nach Gabe des Insulin signifikant erhöht.

Gruppe	Insulin-Inf. (mU/kg/min)	Insulin (ng/ml)	Leptin (ng/ml)
Kontrolle	0	8.1 ± 0.5	73 ± 8
	4.8	13.8 ± 1.3	101 ± 17
	9.6	23.8 ± 3.2	146 ± 30
ARA	0	1.9 ± 0.1 *	97 ± 9
	4.8	13.8 ± 0.6	206 ± 25 *
	9.6	31.8 ± 3.4	453 ± 54 *

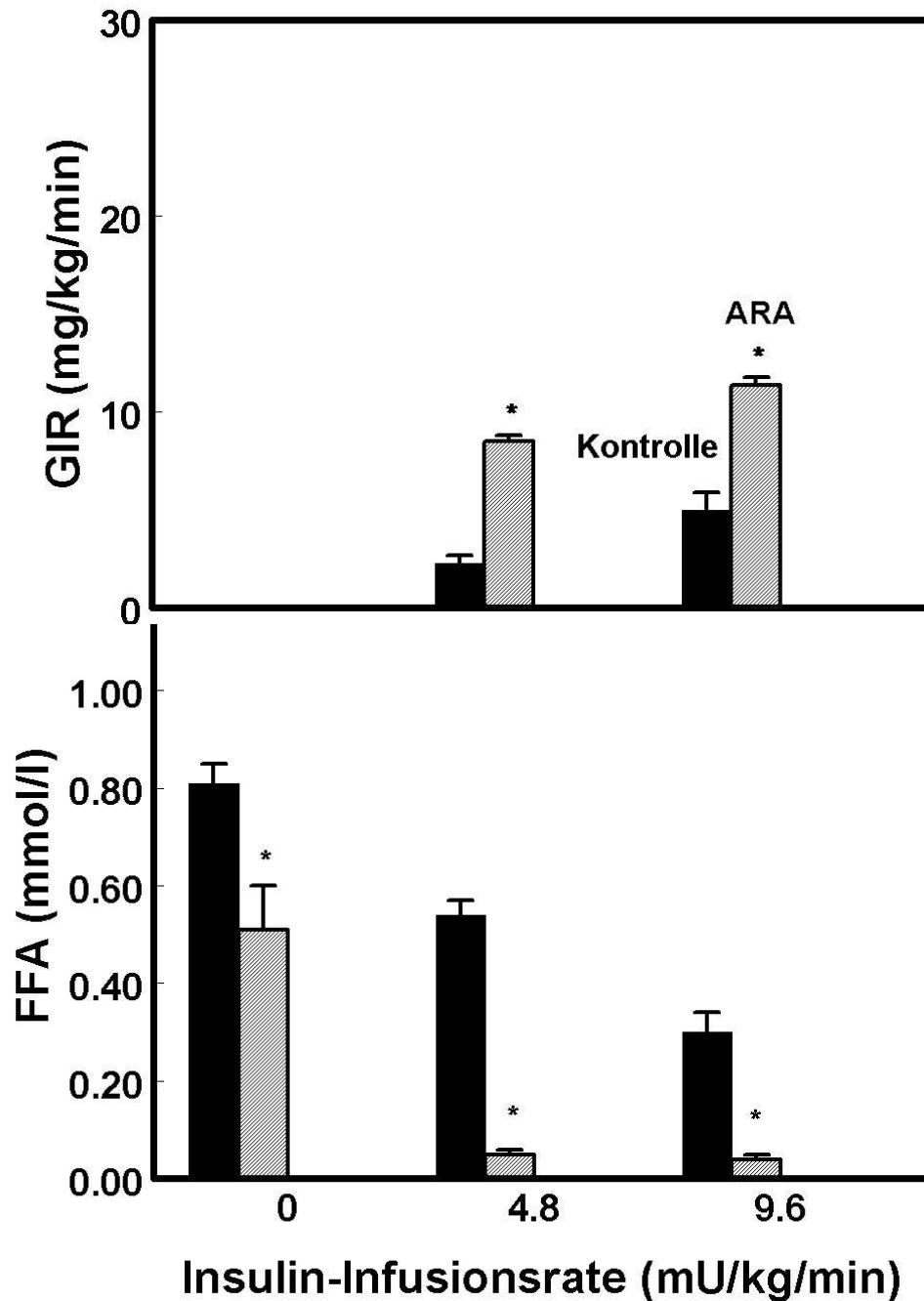
***Tabelle III-15 Plasma-Insulin- und Leptin-Spiegel der unbehandelten (Kontrolle) und der akut mit ARA behandelten ZF Ratten (ARA) während des Glukose-Clamp-Versuchs. Mittelwerte ± SEM bei n=8. \*  $p < 0.05$  vs. Kontrollen.***

#### *III.4.3 Glukose-Infusionsrate und freie Fettsäuren als Parameter der Insulinsensitivität*

Die akute Gabe des fettzellspezifischen und selektiven Adenosin-A<sub>1</sub>-Agonisten ARA führte im Glukose-Clamp-Versuch zu einer deutlichen Verbesserung der Insulinsensitivität. Die Glukose-Infusionsraten waren bei beiden Insulin-Infusionsstufen im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöht (*Abb.III-7*).

ARA senkte die Plasmaspiegel freier Fettsäuren zu allen 3 Zeitpunkten signifikant ab (*Abb.III-7*).

## Glukose-Infusionsrate und Plasmaspiegel freier Fettsäuren während des Glukose-Clamp-Versuchs



**Abb.III-7 Glukose-Infusionsrate und Plasmaspiegel freier Fettsäuren von unbehandelten (Kontrolle) und von akut mit dem Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptor-Agonisten behandelten ZF Ratten (ARA) basal sowie während Insulin-Infusion (4.8 und 9.6mU/kg/min) unter Steady State-Bedingungen (Blutglukose 4-5mmol/l). Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM bei n=8. \*  $p < 0.05$  vs. Kontrollen.**

### *III.4.4 IMCL-Bestimmung mittels Mikroskopie*

Die mikroskopische Untersuchung des M. Soleus ergab keinen Unterschied im IMCL-Gehalt zwischen den akut mit ARA behandelten und den Kontrolltieren. Dies lässt sich mit der akuten Form der Behandlung erklären, die zwar unmittelbar eine ausgeprägte Insulinsensitivitätssteigerung bewirkt hat, aber kurzfristig keine Auswirkung auf das IMCL zeigte. Womöglich könnte eine Langzeit-Behandlung mit ARA einen nachweisbaren Effekt auf das IMCL haben. Auch war zu dem Zeitpunkt der Durchführung dieser Studie die MRS-Methodik noch nicht etabliert. Möglicherweise hätte die weitaus sensitivere MRS eine Abnahme des IMCL infolge der Behandlung detektiert.

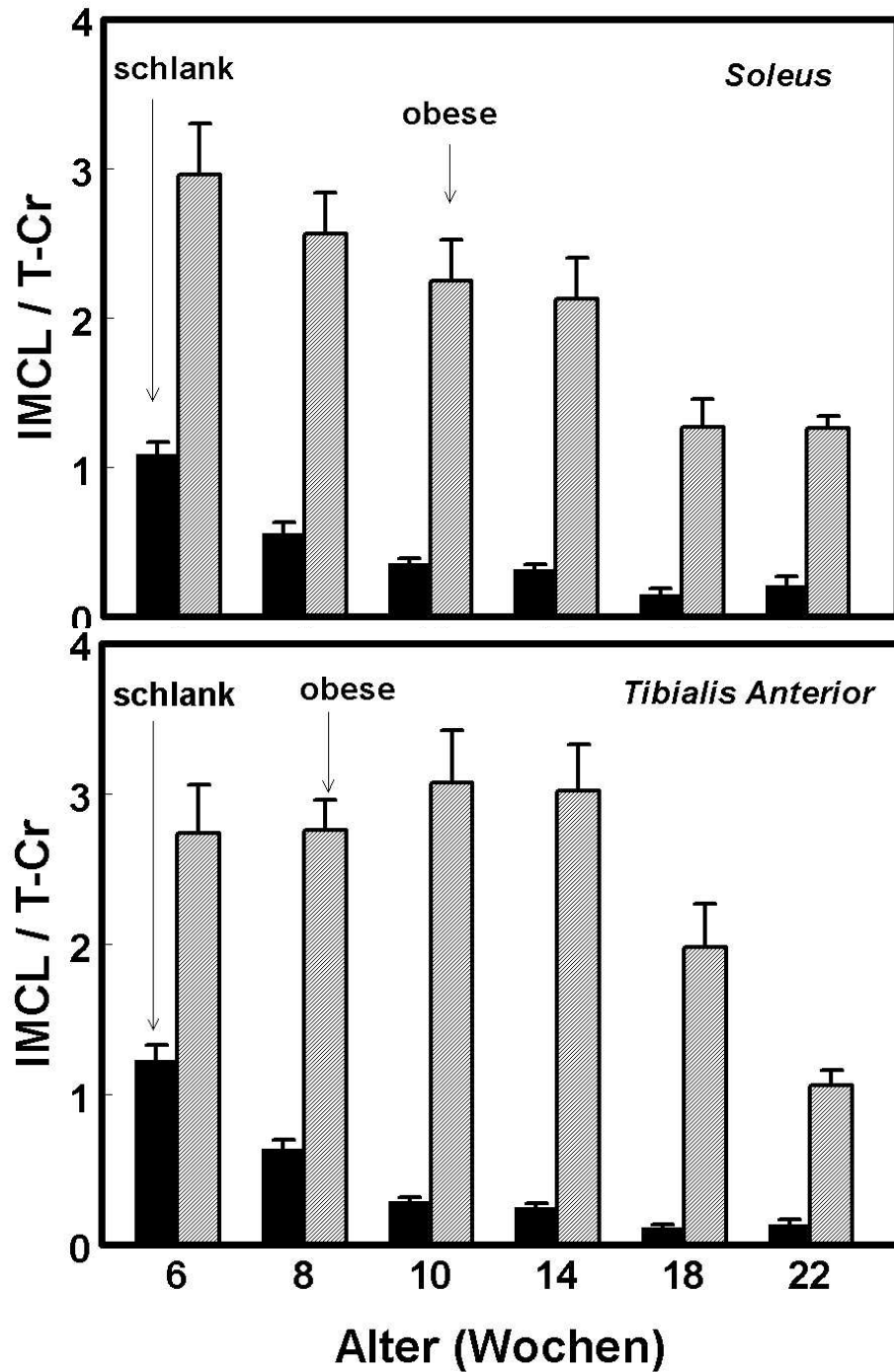
### **III.5 Longitudinale IMCL-Messung bei ZDF Ratten mittels Magnetresonanzspektroskopie**

10 schlanke und 10 obese männliche ZDF Ratten wurden longitudinal mittels MRS auf ihren IMCL-Gehalt sowohl im M. Soleus als auch im M. Tibialis Anterior untersucht. Die MRS-Messungen wurden im Alter von 6, 8, 10, 14, 18 sowie 22 Wochen durchgeführt.

Die longitudinale MRS-Messung mittels MRS zeigte, dass die IMCL-Spiegel sowohl im M. Soleus als auch im M. Tibialis Anterior zu jedem Messzeitpunkt bei den obesen ZDF Ratten signifikant höher lagen als bei ihren schlanken Wurfgeschwistern (*Abb.III-8*). Dabei war kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Muskeltypen feststellbar.



## IMCL-Gehalt im M. Soleus und im M. Tibialis Anterior von ZDF Ratten



**Abb.III-8 Verlaufsmessungen des intramyozellulären Lipids (IMCL) im M. Soleus und Tibialis Anterior mittels Magnetresonanztomographie bei schlanken und obesen ZDF Ratten. Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM bei  $n=10$  je Gruppe. Zu jedem Messzeitpunkt liegt  $p < 0.05$ .**

Im Verlauf der Studie war sowohl im M. Soleus als auch im M. Tibialis Anterior eine Abnahme des IMCL-Gehalts bei den schlanken als auch bei den obesen Tieren zu beobachten. Bei den schlanken Ratten erschien der IMCL-Rückgang vergleichsweise linear und stellt womöglich ein altersabhängiges Phänomen dar. Die obesen ZDF Ratten zeigten vor allem mit fortschreitendem Alter einen deutlichen IMCL-Schwund, was auf die katabole Stoffwechselsituation der zu diesem Zeitpunkt bereits diabetischen Tiere zurückgeführt werden könnte.

### **III.6 Behandlung von ZDF Ratten mit Rosiglitazon bzw. mit einem PPAR $\alpha$ -Agonisten**

#### *III.6.1 Untersuchungen zur Insulinsensitivität bei Behandlungsbeginn*

##### *III.6.1.1 Physiologische Parameter*

5 schlanke und 5 obese männliche ZDF Ratten wurden im Alter von 6 Wochen mit einem mittleren Körpergewicht von  $154 \pm 4\text{g}$  (schlank) sowie  $194 \pm 2\text{g}$  (obese) mittels MRS auf den IMCL-Gehalt im Skelettmuskel sowie im Glukose-Clamp-Versuch auf ihre Insulinsensitivität untersucht.

##### *III.6.1.2 Stoffwechselfparameter im Plasma*

Die Lipidstoffwechselfparameter, die während der Clamp-Studie zu den drei Zeitpunkten  $t=0\text{h}$  (basal),  $t=2\text{h}$  (nach der ersten Insulin-Infusionsrate) und  $t=4\text{h}$  (nach der zweiten Insulin-Infusionsrate) be-

stimmt wurden (vgl. *Abb.II-2*), unterschieden sich bei den schlanken und den obesen ZDF Ratten deutlich voneinander (*Tabelle III-15*).

Die Plasma-Triglyzeridspiegel lagen bei den obesen Tieren basal signifikant höher als bei den schlanken und blieben auch nach Gabe von Insulin in etwa auf gleichem Niveau, wohingegen die Triglyzeridspiegel der schlanken Ratten deutlich abfielen.

Das Plasma-Glyzerol war bei den obesen Tieren zu jedem Zeitpunkt signifikant erhöht.

Das Plasma-Total-Cholesterin lag basal bei beiden Gruppen in etwa gleich hoch. Es fiel mit der Gabe von Insulin ab, wobei der Abfall bei den obesen Ratten signifikant schwächer war als bei den schlanken.

Gruppe	Insulin-Inf. (mU/kg/min)	TG (mmol/l)	Glyzerol ( $\mu$ mol/l)	T-Chol. (mmol/l)
schlank	0	0.20 $\pm$ 0.03	90 $\pm$ 6	1.92 $\pm$ 0.1
	4.8	0.08 $\pm$ 0.03	13 $\pm$ 2	1.41 $\pm$ 0.1
	9.6	0.06 $\pm$ 0.01	10 $\pm$ 3	1.05 $\pm$ 0.1
obese	0	2.81 $\pm$ 0.4 *	227 $\pm$ 5 *	2.16 $\pm$ 0.1
	4.8	3.67 $\pm$ 0.6 *	140 $\pm$ 8 *	1.89 $\pm$ 0.1 *
	9.6	2.66 $\pm$ 0.4 *	111 $\pm$ 8 *	1.54 $\pm$ 0.1 *

***Tabelle III-15 Lipidstoffwechselfparameter von schlanken und obesen, 6 Wo. alten ZDF Ratten während des Glukose-Clamp-Versuchs. Mittelwerte  $\pm$  SEM bei n=5. \*  $p < 0.05$  vs. schlanke Kontrollen.***

Die basalen Plasma-Insulinspiegel waren bei den obesen Tieren im Vergleich zu den schlanken Kontrollen um ein Vielfaches erhöht (*Tabelle III-16*). Auch nach Insulingabe lagen die Insulinspiegel bei den obesen Ratten signifikant höher. Die Leptinspiegel der obesen Ratten waren zu allen 3 Zeitpunkten deutlich erhöht im Vergleich zu den schlanken Tieren.

<b>Gruppe</b>	<b>Insulin-Inf. (mU/kg/min)</b>	<b>Insulin (ng/ml)</b>	<b>Leptin (ng/ml)</b>
schlank	0	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1
	4.8	3.0 ± 0.2	0.7 ± 0.2
	9.6	3.4 ± 0.5	1.6 ± 0.2
obese	0	5.8 ± 0.7 *	22.2 ± 3.1 *
	4.8	7.0 ± 0.5 *	31.4 ± 7.2 *
	9.6	8.8 ± 1.4 *	32.5 ± 6.0 *

***Tabelle III-16 Plasma-Insulin- und Leptin-Spiegel von schlanken und obesen, 6 Wo. alten ZDF Ratten während des Glukose-Clamp-Versuchs. Mittelwerte ± SEM bei n=5. \* p < 0.05 vs. schlanke Kontrollen.***

Die obesen ZDF Ratten zeigten somit bereits im Alter von 6 Wo. eine ausgeprägte Hyperlipidämie, Hyperinsulinämie und Hyperleptinämie; alles Charakteristika einer manifesten Insulinresistenz.

### III.6.1.3 Stoffwechselparameter im Gewebe

Die Triglyzeridspiegel sowohl in der Leber als auch in der Skelettmuskulatur lagen bei beiden Gruppen etwa gleich hoch (Tabelle III-17). Der Gesamtcholesteringehalt der Leber war bei den obesen Ratten im Vergleich zu den schlanken Kontrollen signifikant erhöht. Das Total-Cholesterin im Skelettmuskel lag bei den obesen Tieren tendenziell höher, der Unterschied war aber nicht statistisch signifikant.

Gruppe	Leber-TG (mg/g)	Muskel-TG (mg/g)	Leber-T- Chol. (mg/g)	Muskel-T- Chol. (mg/g)
schlank	2.2 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	13.5 ± 3.0
obese	1.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1	7.0 ± 1.8 *	52.4 ± 16.6

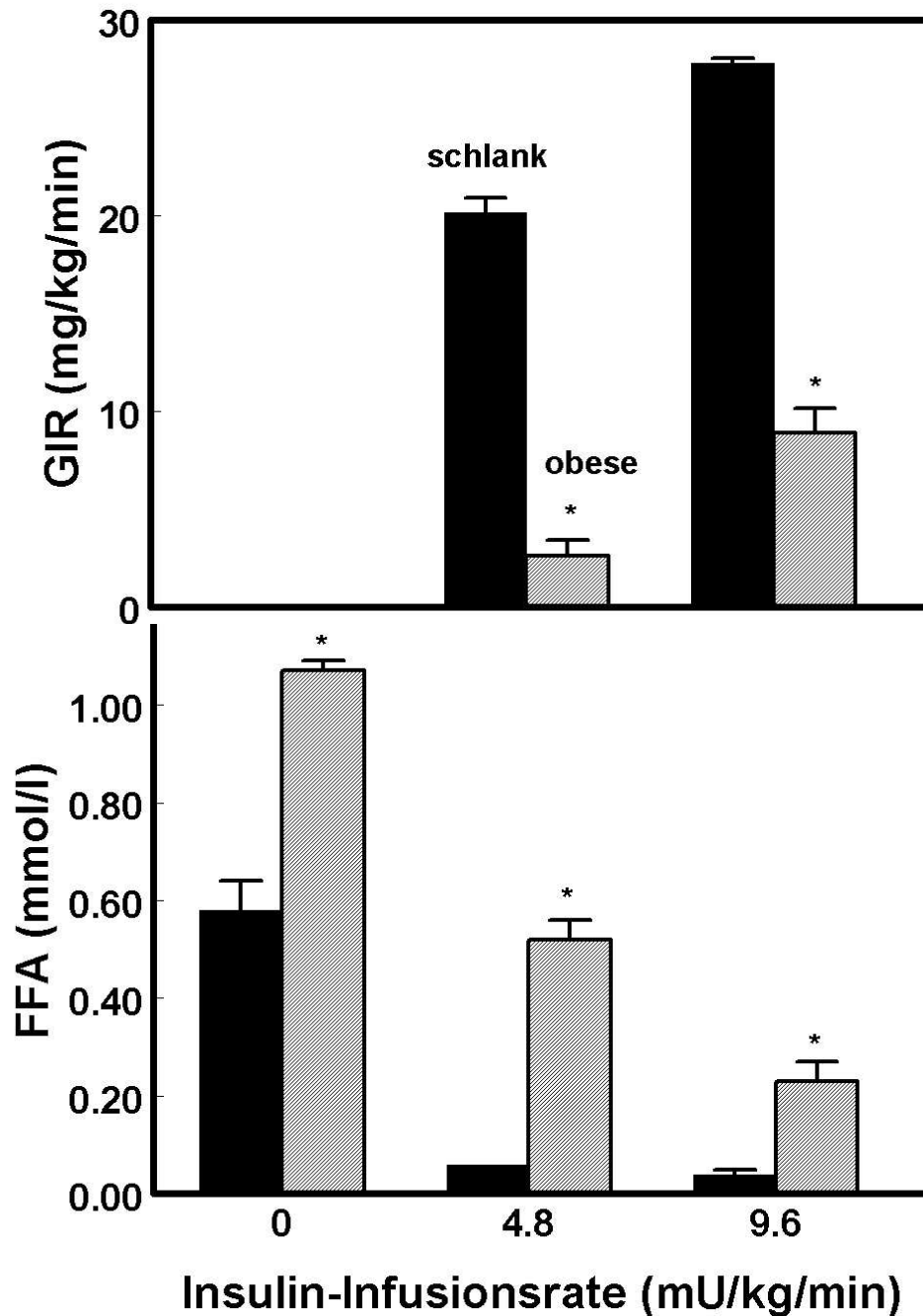
**Tabelle III-17 Triglyzerid- und Gesamtcholesteringehalt der Leber und der Skelettmuskulatur von schlanken und obesen, 6 Wo. alten ZDF Ratten nach dem Glukose-Clamp-Versuch. Mittelwerte ± SEM bei n=5. \*  $p < 0.05$  vs. schlanke Kontrollen.**

### III.6.1.4 Glukose-Infusionsrate und freie Fettsäuren als Parameter der Insulinsensitivität

Im Vergleich zu den insulinsensitiven schlanken Kontrolltieren zeigten die obesen Ratten im Glukose-Clamp-Versuch deutlich niedrigere Glukose-Infusionsraten (Abb.III-9).

Auch die Plasmaspiegel freier Fettsäuren (FFA) unterschieden sich signifikant von den schlanken Kontrolltieren (Abb.III-9).

## Glukose-Infusionsrate und Plasmaspiegel freier Fettsäuren während des Glukose-Clamp-Versuchs



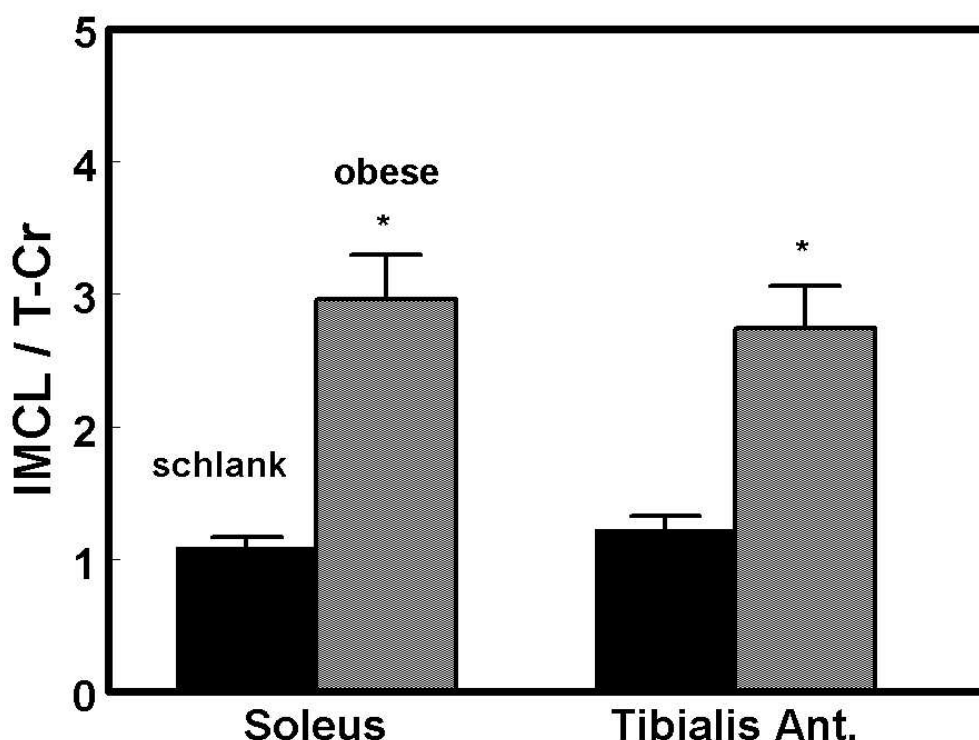
**Abb.III-9 Glukose-Infusionsrate und Plasmaspiegel freier Fettsäuren von schlanken und obesen, 6 Wo. alten ZDF Ratten basal sowie während Insulin-Infusion (4.8 und 9.6mU/kg/min) unter Steady State-Bedingungen (Blutglukose 4-5mmol/l). Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM bei n=5. \*  $p < 0.05$  vs. schlanke Kontrollen.**

Im Glukose-Clamp zeigten die 6 Wochen alten obesen Tiere somit eine ausgeprägte funktionelle Insulinresistenz.

#### *III.6.1.5 IMCL-Bestimmung mittels MRS*

Am Vortag des Glukose-Clamp-Versuchs wurde der IMCL-Gehalt in der Skelettmuskulatur der ZDF Ratten gemessen. Der IMCL-Gehalt sowohl im M. Soleus als auch im M. Tibialis Anterior der obesen Ratten war gegenüber dem der schlanken Kontrolltiere signifikant erhöht (*Abb.III-10*).

### **IMCL-Gehalt des M. Soleus und des M. Tibialis Anterior bei Behandlungsbeginn**



***Abb.III-10 Intramyozelluläres Lipid (IMCL) im M. Soleus und im M. Tibialis Anterior von schlanken und obesen, 6 Wo. alten ZDF Ratten, gemessen mittels MRS. Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM bei  $n=5$ . \*  $p < 0.05$  vs. schlanke Kontrollen.***

Der signifikant erhöhte IMCL-Gehalt in der Skelettmuskulatur der obesen ZDF Ratten korrespondierte mit der signifikant herabgesetzten Insulinsensitivität dieser Tiere.

### *III.6.2 Behandlung mit Rosiglitazon bzw. mit einem PPAR $\alpha$ -Agonisten*

#### *III.6.2.1 Physiologische Parameter*

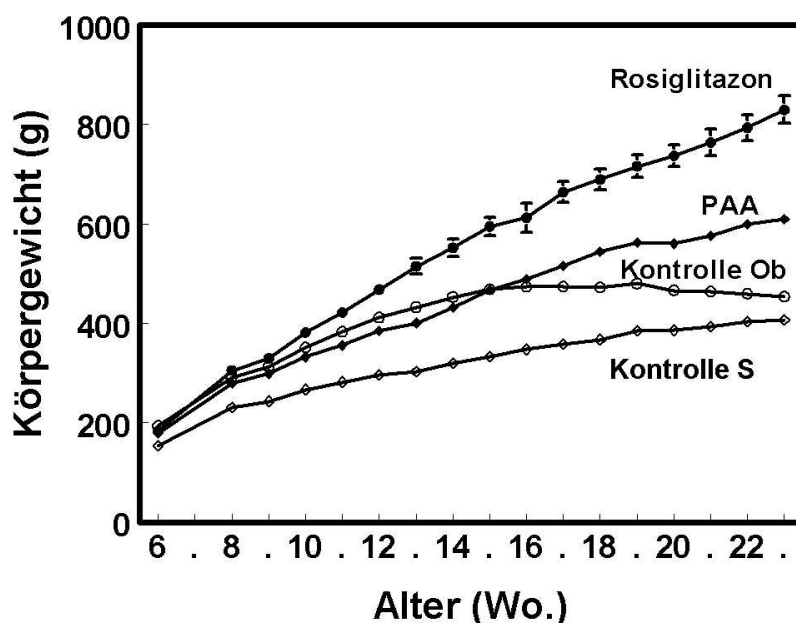
Jeweils 8 obese männliche ZDF Ratten wurden ab der 6. Lebenswoche über einen Zeitraum von 17 Wochen mit dem PPAR $\gamma$ -Agonisten Rosiglitazon bzw. mit dem PPAR $\alpha$ -Agonisten PAA behandelt; als Kontrolltiere dienten 8 unbehandelte obese sowie 8 unbehandelte schlanke Tiere.

Die Körpergewichtsentwicklung der ZDF Ratten über den Behandlungszeitraum verlief unterschiedlich (*Abb.III-11*). Die schlanken Kontrolltiere sowie die mit Rosiglitazon bzw. mit PAA behandelten obesen Ratten zeigten eine annähernd lineare Wachstumskurve. Das mittlere Körpergewicht der obesen unbehandelten Kontrolltiere hingegen stieg bis zur 15. Lebenswoche an, stagnierte dann mit dem Ausbruch des Diabetes und begann ab der 20. LW leicht abzufallen.

Der mittlere Körpergewichtszuwachs über den Zeitraum der Studie lag bei den behandelten Tieren signifikant über dem der unbehandelten (*Tabelle III-18*). Die behandelten Ratten untereinander (Rosiglitazon versus PAA) unterschieden sich in der mittleren Gewichtszunahme ebenfalls signifikant, wobei die Rosiglitazon-behandelten Tiere den deutlich höchsten Körpergewichtszuwachs aufwiesen.



## Körpergewichtsentwicklung der ZDF Ratten über den Zeitraum von 17 Wochen



**Abb.III-11 Körpergewichtsentwicklung der verschiedenen Gruppen: schlanke ZDF Ratten (Kontrolle S), obese ZDF Ratten (Kontrolle Ob), mit Rosiglitazon bzw. PAA behandelte obese ZDF Ratten. Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM bei  $n=8$  je Gruppe.**

Gruppe	Zahl (n)	Mittlere Gewichts- zunahme (g)
Kontrolle S	8	252 $\pm$ 5
Kontrolle Ob	8	260 $\pm$ 10
Rosiglitazon	8	643 $\pm$ 23 *
PAA	8	431 $\pm$ 9 *†

**Tabelle III-18 Mittlere Körpergewichtszunahme der verschiedenen Gruppen: schlanke ZDF Ratten (Kontrolle S), obese ZDF Ratten (Kontrolle Ob), mit Rosiglitazon bzw. PAA behandelte obese ZDF Ratten. Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM und errechnen sich aus der Differenz zwischen Anfangs- und End-Körpergewicht. \*  $p < 0.05$  vs. schlanke Kontrollen; †  $p < 0.05$  vs. Rosiglitazon.**

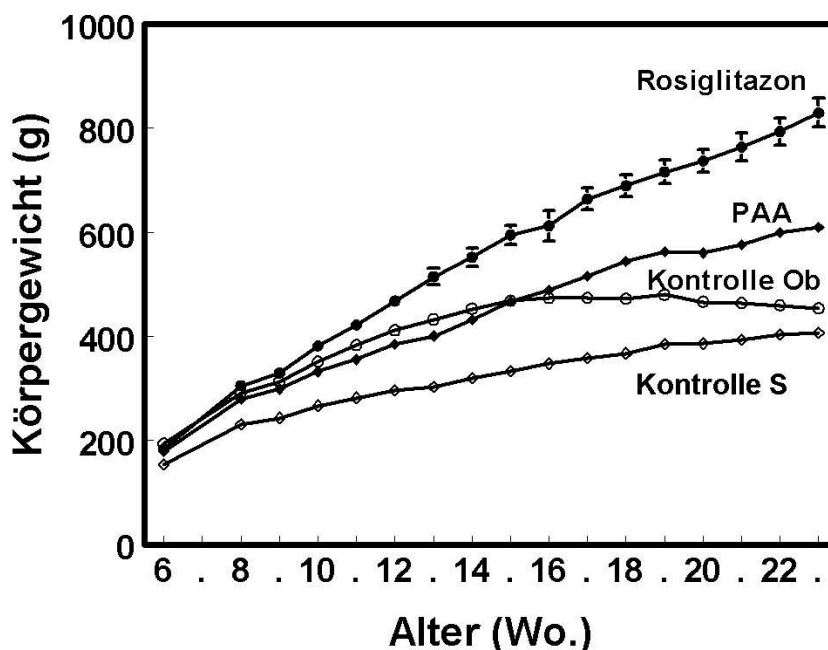
### *III.6.2.2 Stoffwechselparameter im Plasma*

Im Verlauf der Studie wurden bei den Tieren alle 14 Tage die Blutglukose-, die Triglyzerid- und die Insulinspiegel im Plasma bestimmt.

Die Blutglukose-Spiegel lagen bis zum Alter von etwa 10 Wochen bei allen Gruppen annähernd auf gleichem Niveau, danach stieg die Blutglukose bei den obesen Kontrolltieren signifikant an (*Abb.III-12*). In der Altersphase von 14 bis 16 Wochen war bei dieser Gruppe erneut ein ausgeprägter Anstieg festzustellen, wohingegen die Blutglukose-Spiegel bei den schlanken und bei den obesen behandelten Tieren über den gesamten Studien-Zeitraum annähernd konstant bei 6-7mmol/l lagen.

Die sich im Alter von 10 bis 12 Wochen entwickelnde und im weiteren Verlauf markant ansteigende Hyperglykämie der obesen Kontrolltiere geht zeitgleich einher mit der Stagnation der Körpergewichtszunahme (vgl. *Abb.III-11*) und markiert offensichtlich den Ausbruch des Diabetes. Sowohl die entgleiste Blutglukose-Homöostase als auch der Gewichtsverlust sind Indikatoren einer katabolen diabetischen Stoffwechselsituation.

## Verlauf der Blutglukose-Spiegel bei den ZDF-Ratten

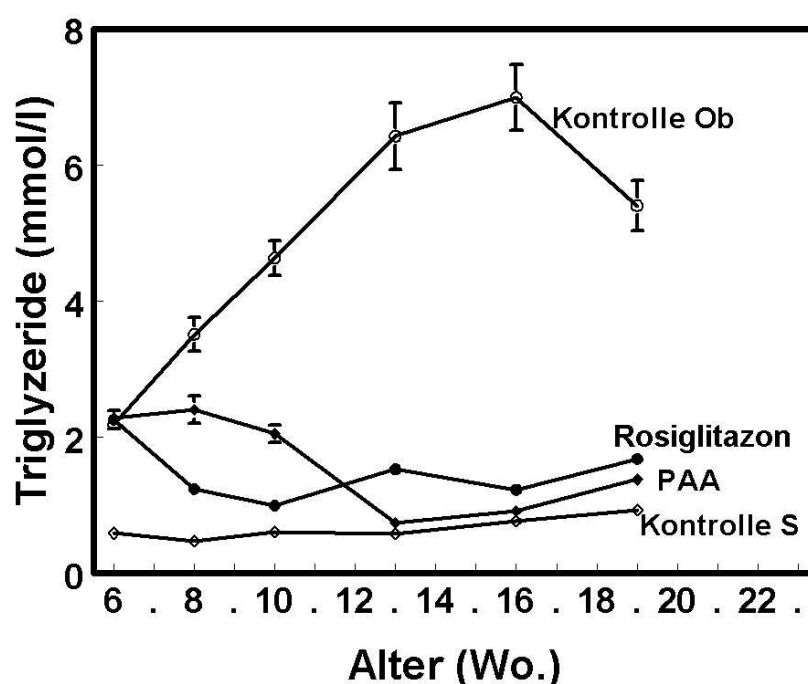


**Abb.III-12 Blutglukose-Spiegel bei den verschiedenen Gruppen: schlanke ZDF Ratten (Kontrolle S), obese ZDF Ratten (Kontrolle Ob), mit Rosiglitazon bzw. PAA behandelte obese ZDF Ratten. Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM bei  $n=8$  je Gruppe.**

Die Triglyzerid-Spiegel lagen im Alter von 6 Wochen bei den obesen behandelten und unbehandelten ZDF Ratten nahezu dreifach höher (über 2.2mmol/l) als bei den schlanken Tieren (unter 0.6mmol/l). Bei den unbehandelten obesen Tieren stiegen sie bis auf etwa 7mmol/l im Alter von 16 Wo. an und begannen dann, deutlich abzufallen (Abb.III-13). Die Plasma-Triglyzeridspiegel der schlanken Kontrollen verliefen annähernd konstant; die der obesen behandelten Tiere näherten sich im Verlauf der Behandlung den Werten der schlanken Ratten an.

Der Abfall der Plasma-Triglyzeridspiegel im Anschluss an die ausgeprägte Hypertriglyzeridämie der obesen unbehandelten Kontrollen tritt in etwa zeitgleich mit dem abrupten, deutlichen Anstieg der Blutglukose und der Stagnation des Körpergewichts auf (vgl. *Abb.III-11 & III-12*). Insgesamt markieren diese ausgeprägten Veränderungen der Stoffwechselfparameter den Ausbruch des Diabetes.

### Verlauf der Plasma-Triglyzeridspiegel bei den ZDF-Ratten



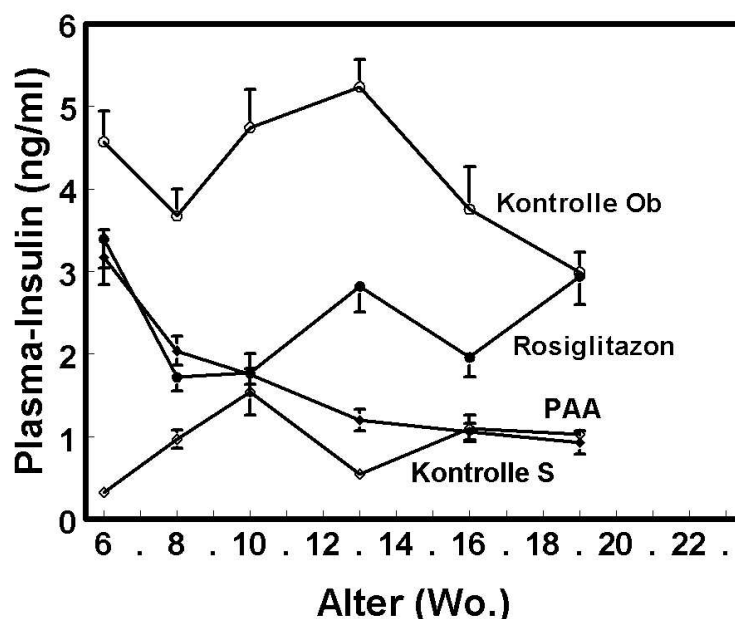
**Abb.III-13 Triglyzerid-Spiegel im Plasma bei den verschiedenen Gruppen: schlanke ZDF Ratten (Kontrolle S), obese ZDF Ratten (Kontrolle Ob), mit Rosiglitazon bzw. PAA behandelte obese ZDF Ratten. Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM bei  $n=8$  je Gruppe.**

Die basalen Plasma-Insulinspiegel lagen bei den schlanken Kontrollen im Alter von sechs Wochen um ein Vielfaches niedriger als bei den obesen behandelten und unbehandelten Tieren (0.33 ng/ml versus 3-4 ng/ml); sie blieben über den gesamten Studienzeitraum auf relativ konstantem Niveau (*Abb.III-14*). Die Plasma-Insulinspiegel der Rosiglitazon-behandelten Tiere waren starken Schwankungen unterworfen; sie lagen tendenziell höher als die der schlanken Kontrollen, gleichzeitig aber niedriger als die der unbehandelten obesen. Die Plasma-Insulinspiegel der mit PAA behandelten Ratten hingegen näherten sich ab der 13.LW den Werten der schlanken Kontrollen an. Im Alter von etwa 13 Wochen erreichten die Insulinspiegel der obesen Kontrollen ihr Maximum, danach fielen sie deutlich ab.

Dieser Abfall des Insulins bei den obesen Kontrolltieren tritt in etwa zeitgleich mit dem ausgeprägten Anstieg der Blutglukose und dem Abfall der Plasmatriglyzeride im Anschluss an die deutliche Hypertriglyzeridämie auf und markiert den Zeitpunkt des Diabetes-Ausbruchs (vgl. *Abb.III-12* & *Abb.III-13*).

Bei den behandelten obesen Tieren bleibt sowohl die Ausbildung einer Hyperglykämie als auch einer Hypertriglyzeridämie aus. Auch die Plasma-Insulinwerte befinden sich in etwa auf dem Niveau der schlanken Kontrollen. Die Ausbildung des Typ II Diabetes mit seinen charakteristischen Stoffwechselentgleisungen (Hyperglykämie, Hypoinsulinämie) bleibt aus. Auch die Wachstumskurve der Tiere verläuft annähernd linear, wobei die mittlere Gewichtszunahme über den Behandlungszeitraum bei den behandelten obesen Tieren deutlich höher liegt als bei den schlanken Kontrollen (vgl. *Tab.III-18*).

### Verlauf der Plasma-Insulinspiegel bei den ZDF-Ratten



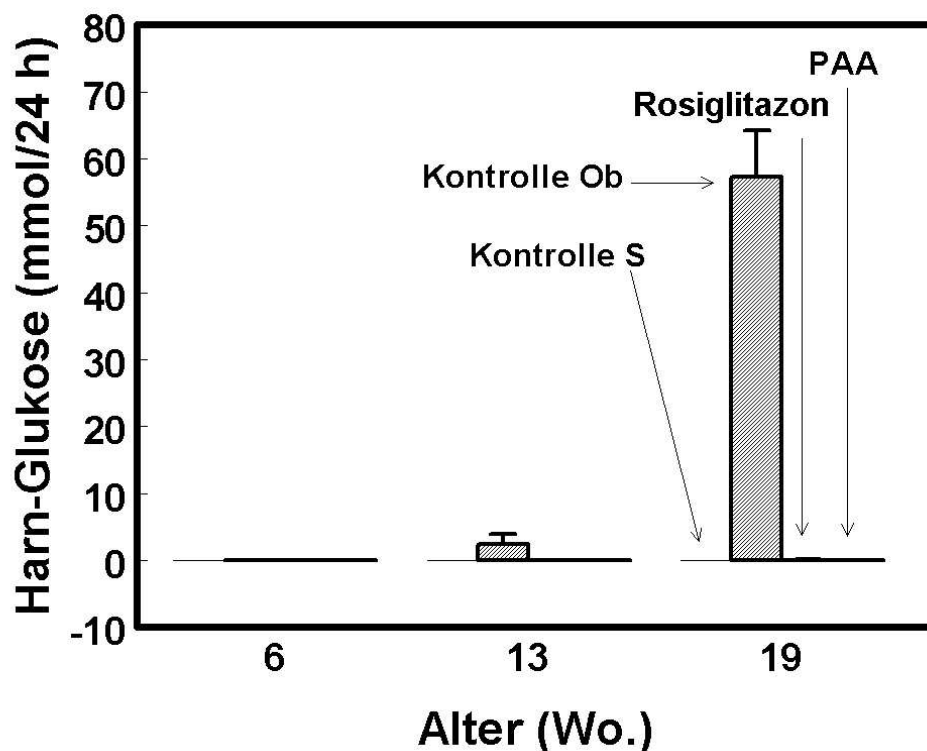
**Abb.III-14** *Insulinspiegel im Plasma bei den verschiedenen Gruppen: schlanke ZDF Ratten (Kontrolle S), obese ZDF Ratten (Kontrolle Ob), mit Rosiglitazon bzw. PAA behandelte obese ZDF Ratten. Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM bei n=8 je Gruppe.*

#### III.6.2.3 Stoffwechselfparameter im Urin

Im Alter von 6, 13 und 19 Wochen wurden bei den Tieren Glukose und Albumin im Urin bestimmt, um so eine Aussage über die Nierenfunktion zu erhalten.

Im Urin der schlanken Kontrollen und der behandelten Tiere wurde zu keinem Zeitpunkt Glukose gefunden (Abb.III-15). Die unbehandelten obesen Ratten schieden in der 6.LW keine messbaren Glukosemengen mit dem Urin aus, in der 13.LW dann 2.4mmol Glukose über 24h; in der 19. Lebenswoche wiesen die Tiere eine deutliche Glukosurie (57.3mmol Glukose innerhalb von 24h) auf.

## Glukose im Urin der ZDF Ratten

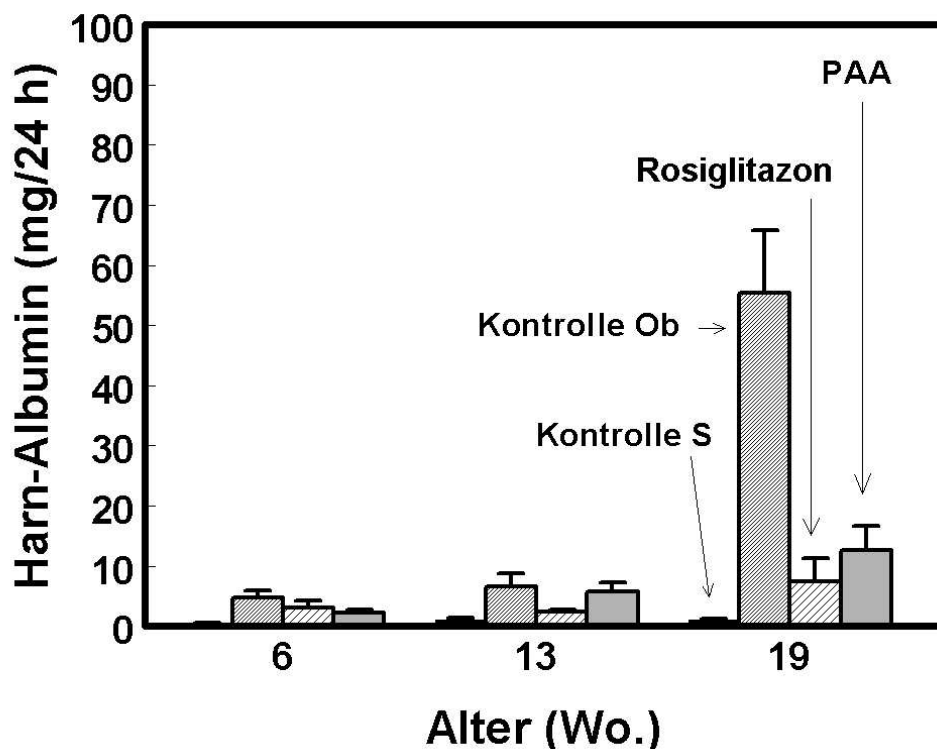


**Abb.III-15** Über den Urin innerhalb von 24h ausgeschiedene Glukose bei den verschiedenen Gruppen: schlanke ZDF Ratten (Kontrolle S), obese ZDF Ratten (Kontrolle Ob), mit Rosiglitazon bzw. PAA behandelte obese ZDF Ratten. Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM bei  $n=8$  je Gruppe.

Im Urin der schlanken Kontrollen und der behandelten Tiere wurden im Verlauf der Studie keine relevanten Albumin-Mengen festgestellt (Abb.III-16). Die obesen Kontrollratten hingegen zeigten im Alter von 19 Wochen eine Mikroalbuminurie (mehr als 50mg Albumin/24h).

Per definitionem spricht man von einer Mikroalbuminurie, wenn innerhalb von 3 Monaten zweimal 30-300mg Albumin/24h im Urin gemessen werden (Hornych et al., 2000; Isomaa et al., 2001).

### Albumin im Urin der ZDF Ratten



**Abb.III-16** Über den Urin innerhalb von 24h ausgeschiedenes Albumin bei den verschiedenen Gruppen: schlanke ZDF Ratten (Kontrolle S), obese ZDF Ratten (Kontrolle Ob), mit Rosiglitazon bzw. PAA behandelte obese ZDF Ratten. Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM bei  $n=8$  je Gruppe.

#### III.6.2.4 Longitudinale Bestimmung des IMCL mittels MRS

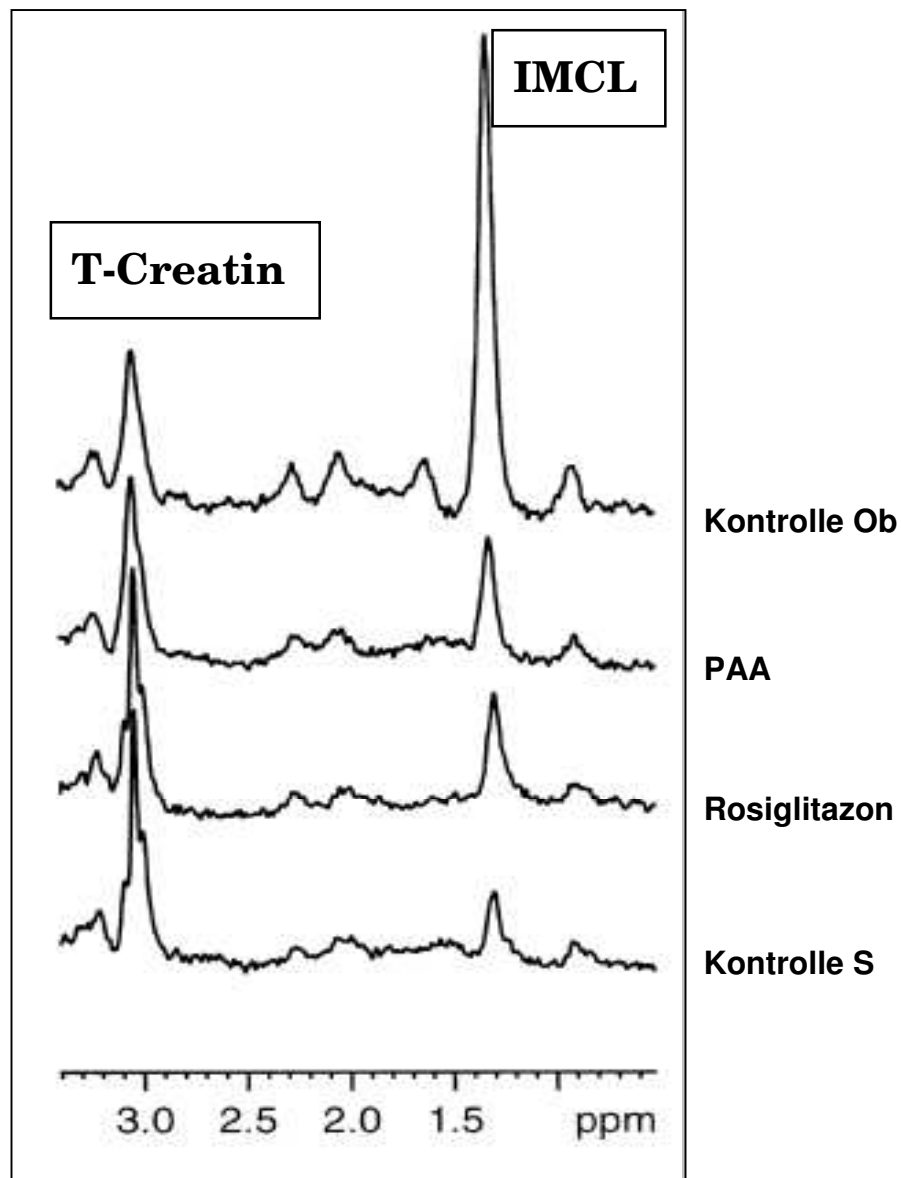
Im Verlauf der Studie wurde wiederholt der IMCL-Gehalt der Tiere im M. Tibialis Anterior gemessen. Auch im M. Soleus wurden Messungen durchgeführt.

Die Einzelspektren der verschiedenen Gruppen ließen bereits vor der Auswertung Rückschlüsse auf die jeweilige IMCL-Menge zu. Die schlanken Kontrollen zeigten beispielsweise im Alter von 16 Wochen bei 1.4ppm (IMCL-Signal) das eindeutig schwächste Signal, während



die obesen unbehandelten Ratten einen hohen Signalpeak und somit ein ausgeprägtes IMCL-Signal aufwiesen (Abb.III-17).

### MRS-Spektren einzelner ZDF Ratten



**Abb.III-17** Mittels MRS im *M. Tibialis Anterior* gemessene repräsentative Lipid-Spektren einzelner Tiere im Alter von 16 Wo.; von unten nach oben: schlanke ZDF Ratte (Kontrolle S), mit Rosiglitazon behandelte obese ZDF Ratte, mit PAA behandelte obese ZDF Ratte, obese unbehandelte ZDF Ratte (Kontrolle Ob). IMCL-Signal bei 1.4ppm, T-Creatin-Signal bei 3.05ppm.

Der IMCL-Gehalt im M. Tibialis Anterior war zu Beginn der Studie bei den obesen Tieren annähernd doppelt so hoch wie bei den schlanken Kontrollen (*Abb.III-18*).

Im Alter von 16 Wochen lag der IMCL-Gehalt sowohl bei den schlanken als auch bei den obesen unbehandelten Ratten niedriger als basal im Alter von 6 Wochen, war aber bei den obesen weiterhin signifikant erhöht. Diese generelle Abnahme der IMCL-Spiegel über den Zeitverlauf ist womöglich ein altersabhängiges Phänomen: mit steigendem Lebensalter nimmt das IMCL physiologischerweise ab (Neumann-Haefelin et al., 2002).

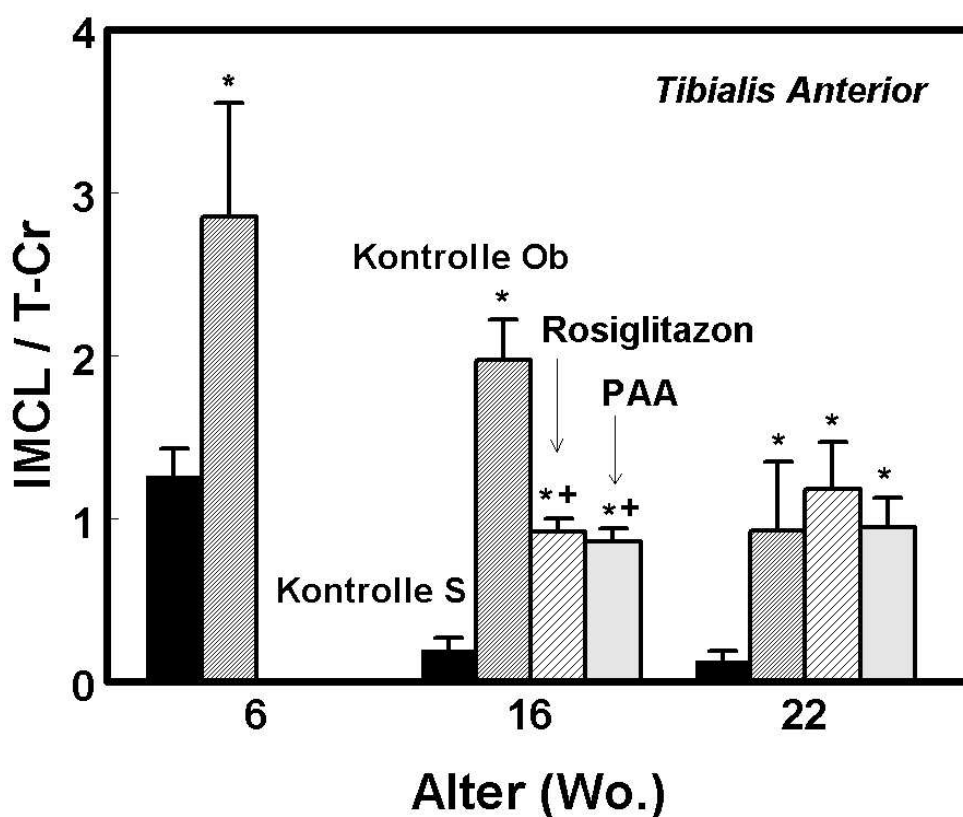
Im Alter von 22 Wochen hatte sich das IMCL der schlanken Kontrollen kaum verändert, wohingegen es bei den obesen Kontrollen weiter abgenommen hatte, aber immer noch signifikant höher lag als bei den schlanken Tieren. Dieser kontinuierliche Schwund des IMCL bei den obesen Kontrollen lässt sich neben der Altersabhängigkeit mit der katabolen Stoffwechsellage der zu diesem Zeitpunkt diabetischen, also kranken Tiere erklären: aufgrund ihrer desolaten Stoffwechselsituation werden sämtliche Energiereserven mobilisiert, auch Lipide in Form von IMCL.

Infolge der Behandlung mit Rosiglitazon bzw. mit PAA waren die IMCL-Spiegel im M. Tibialis Anterior der 16 Wochen alten behandelten obesen Ratten deutlich abgesenkt, sie lagen jedoch signifikant über den IMCL-Werten der schlanken Kontrollen.

Im Alter von 22 Wochen hatte sich das IMCL der behandelten Tiere gegenüber dem 16 Wochen-Wert praktisch nicht verändert, es lag weiterhin signifikant über dem IMCL-Wert der schlanken Tiere. Dies zeigt, dass der maximale Effekt der PPAR-Agonisten auf das IMCL bereits im Alter von 16 Wochen erreicht war. Das IMCL der behan-

delten Tiere entsprach größenordnungsmäßig im Alter von 22 Wochen annähernd dem der obesen Kontrollen; dies lässt sich wiederum mit der Lipid-Mobilisierung der obesen Kontrollen infolge der Diabetes-Manifestation und der damit verbundenen katabolen Stoffwechselsituation erklären.

### IMCL-Messungen im M. Tibialis Anterior im Verlauf der Studie



**Abb.III-18 Verlaufsmessungen des intramyozellulären Lipids (IMCL) im M. Tibialis Anterior bei den verschiedenen Gruppen: schlanke ZDF Ratten (Kontrolle S), obese ZDF Ratten (Kontrolle Ob), mit Rosiglitazon bzw. PAA behandelte obese ZDF Ratten. Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM bei  $n=8$  je Gruppe. \*  $p < 0.05$  vs. schlanke Kontrollen, +  $p < 0.05$  vs. obese Kontrollen.**

### *III.6.3 Untersuchungen zur Insulinsensitivität nach viermonatiger Behandlung mit Rosiglitazon bzw. mit einem PPAR $\alpha$ -Agonisten*

#### *III.6.3.1 Physiologische Parameter*

7 schlanke, 7 unbehandelte obese, 6 mit Rosiglitazon behandelte und 5 mit dem PPAR $\alpha$ -Agonisten PAA behandelte obese männliche ZDF Ratten wurden im Alter von 22 bis 24 Wochen mit einem mittleren Körpergewicht von  $406 \pm 3\text{g}$  (schlank),  $454 \pm 11\text{g}$  (obese) sowie  $829 \pm 28\text{g}$  (obese + Rosiglitazon) und  $609 \pm 11\text{g}$  (obese + PAA) mittels MRS auf den IMCL-Gehalt im Skelettmuskel sowie im Glukose-Clamp-Versuch auf ihre Insulinsensitivität untersucht.

#### *III.6.3.2 Stoffwechselparameter im Plasma*

Die Lipidstoffwechselparameter, die während des Glukose-Clamp-Versuchs zu den drei Zeitpunkten  $t=0\text{h}$  (basal),  $t=2\text{h}$  (nach der ersten Insulin-Infusionsrate) und  $t=4\text{h}$  (nach der zweiten Insulin-Infusionsrate) bestimmt wurden (vgl. *Abb.II-2*), unterschieden sich bei den verschiedenen Gruppen deutlich voneinander (*Tabelle III-19*).

Die Plasma-Triglyzeridspiegel waren bei den obesen unbehandelten Tieren im Vergleich zu den schlanken Kontrollen und den behandelten Tieren zu allen 3 Zeitpunkten signifikant erhöht, wobei die Triglyzeridspiegel bei allen Gruppen durch Insulingabe abfielen. Die Plasma-Triglyzeridspiegel der behandelten Tiere lagen signifikant höher als die der schlanken Kontrollen. Zwischen den Triglyzeridspiegeln der mit Rosiglitazon und der mit PAA behandelten Ratten gab es basal und nach der  $4.8\text{ mU/kg/min}$ -Insulin-Infusion einen signifikanten Unterschied; die Plasmaspiegel der Rosiglitazon-Tiere lagen höher.

Die Glyzerolspiegel im Plasma sanken bei allen Gruppen nach Insulingabe ab. Das Plasma-Glyzerol lag bei den behandelten und bei den obesen Tieren zu jedem Zeitpunkt signifikant höher als bei den schlanken Kontrollen. Dabei waren die Glyzerolspiegel der mit PAA behandelten Tiere in etwa dreimal so hoch wie die der unbehandelten obesen Ratten. Die mit Abstand höchsten Glyzerolspiegel wurden zu allen 3 Zeitpunkten bei der Rosiglitazon-Gruppe gemessen. Dies hängt mit dem Wirkmechanismus des Rosiglitazon zusammen: Rosiglitazon stimuliert die intravasale Lipolyse, indem es u.a. die LPL aktiviert. Somit steigen die Glyzerol-Spiegel an. Die gleichzeitig vermehrt anfallenden FFA werden durch Induktion von Fettsäure-Transporter-Proteinen unmittelbar aus der Zirkulation entfernt.

Die Cholesterinspiegel sanken bei allen vier Gruppen im Verlauf des Glukose-Clamp-Versuchs. Das Plasma-Total-Cholesterin lag basal bei den obesen Kontrollen und bei den mit Rosiglitazon behandelten Tieren signifikant über den Plasmaspiegeln der beiden anderen Gruppen (PAA sowie schlanke Kontrollen). Nach Infusion der 4.8mU/kg/min-Insulinkonzentration lagen im Vergleich zu den schlanken Tieren die Cholesterinspiegel aller 3 anderen Gruppen signifikant höher, wobei die obesen unbehandelten Ratten die höchsten Cholesterinwerte aufwiesen. Am Ende der zweiten Insulin-Infusions-Stufe zeigten wiederum die obese Kontroll- und die Rosiglitazon-Gruppe signifikant höhere Cholesterinspiegel als die beiden anderen Gruppen. Die Werte der obesen Kontrollen lagen doppelt so hoch wie die der Rosiglitazon-Tiere.

Gruppe	Insulin- Inf. (mU/kg/ min)	TG (mmol/l)	Glyzerol ( $\mu$ mol/l)	T-Chol. (mmol/l)
Kontrolle S	0	0.37 $\pm$ 0.05	72 $\pm$ 5	1.96 $\pm$ 0.1
	4.8	0.21 $\pm$ 0.02	10 $\pm$ 1	1.67 $\pm$ 0.1
	9.6	0.20 $\pm$ 0.05	14 $\pm$ 4	1.48 $\pm$ 0.1
Kontrolle Ob	0	4.44 $\pm$ 0.7 *†#	104 $\pm$ 12 *†#	4.78 $\pm$ 0.3 *†#
	4.8	3.05 $\pm$ 0.3 *†#	42 $\pm$ 14 *†#	4.41 $\pm$ 0.2 *†#
	9.6	3.18 $\pm$ 0.2 *†#	45 $\pm$ 12 *†#	4.04 $\pm$ 0.2 *†#
Rosiglita- zon	0	1.52 $\pm$ 0.1 *	1034 $\pm$ 86 *	3.01 $\pm$ 0.2 *
	4.8	1.08 $\pm$ 0.1 *	613 $\pm$ 81 *	2.84 $\pm$ 0.1 *
	9.6	0.80 $\pm$ 0.1 *	420 $\pm$ 54 *	2.65 $\pm$ 0.1 *
PAA	0	0.90 $\pm$ 0.2 *†	332 $\pm$ 68 *†	2.17 $\pm$ 0.2 †
	4.8	0.78 $\pm$ 0.1 *†	136 $\pm$ 13 *†	2.05 $\pm$ 0.2 *†
	9.6	0.64 $\pm$ 0.1 *	113 $\pm$ 18 *†	1.81 $\pm$ 0.1 †

**Tabelle III-19 Lipidstoffwechselparameter der verschiedenen Gruppen im Alter von 22-24 Wochen: schlanke ZDF Ratten (Kontrolle S; n=7), obese ZDF Ratten (Kontrolle Ob; n=7), mit Rosiglitazon (n=6) bzw. PAA (n=5) behandelte obese ZDF Ratten. Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  vs. schlanke Kontrollen; †  $p < 0.05$  vs. Rosiglitazon, #  $p < 0.05$  vs. PAA.**

Die Plasma-Insulinspiegel der schlanken Kontrollen sowie der mit PAA behandelten Tiere lagen basal in etwa gleich hoch und stiegen infolge der Insulin-Infusion kontinuierlich an (*Tabelle III-20*). Der basale Insulinwert der obesen unbehandelten Ratten lag niedriger und unterschied sich signifikant von dem der PAA-Tiere. Im Verlauf des Glukose-Clamp-Versuchs stieg das Insulin bei dieser Gruppe ebenfalls an; die Plasmaspiegel entsprachen in etwa denen der schlanken Kontroll- und der PAA-Gruppe. Die Plasma-Insulinspiegel der Rosiglitazon-behandelten Tiere waren im Vergleich zu den übrigen Gruppen zu jedem der 3 Zeitpunkte annähernd zweifach erhöht.

Das Plasma-Leptin stieg bei den schlanken Kontrollen im Verlauf des Glukose-Clamp-Versuchs gleichmäßig an (*Tabelle III-20*). Dieser Anstieg wurde auch bei den drei anderen Gruppen beobachtet, die Leptinspiegel lagen bei ihnen aber zu allen drei Zeitpunkten signifikant höher. Hierbei wiesen die Rosiglitazon-behandelten Ratten die mit Abstand höchsten Leptinspiegel auf. Sie waren signifikant erhöht im Vergleich zu den PAA-Tieren. Beide behandelten Gruppen zeigten im Vergleich zu den obesen Kontrollen signifikant erhöhte Plasmaspiegel.

Gruppe	Insulin-Inf. (mU/kg/min)	Insulin (ng/ml)	Leptin (ng/ml)
Kontrolle S	0	3.5 ± 1.6	0.9 ± 0.3
	4.8	6.4 ± 0.1	3.9 ± 0.7
	9.6	9.5 ± 1.3	8.3 ± 1.1
Kontrolle Ob	0	1.1 ± 0.3 †#	10.5 ± 2.9 *†#
	4.8	5.6 ± 0.5 †	20.3 ± 3.9 *†#
	9.6	9.0 ± 1.5 †	24.9 ± 3.9 *†#
Rosiglitazon	0	6.2 ± 1.2	197 ± 12 *
	4.8	11.0 ± 0.7 *	204 ± 12*
	9.6	25.2 ± 2.8 *	229 ± 18 *
PAA	0	3.9 ± 0.8	88 ± 14 *†
	4.8	6.3 ± 0.4 †	97 ± 7 *†
	9.6	10.4 ± 1.7 †	150 ± 27 *†

**Tabelle III-20 Insulin- und Leptin-Spiegel im Plasma der verschiedenen Gruppen im Alter von 22-24 Wochen: schlanke ZDF Ratten (Kontrolle S; n=7), obese ZDF Ratten (Kontrolle Ob; n=7), mit Rosiglitazon (n=6) bzw. PAA (n=5) behandelte obese ZDF Ratten. Werte sind Mittelwerte ± SEM. \*  $p < 0.05$  vs. schlanke Kontrollen; †  $p < 0.05$  vs. Rosiglitazon, #  $p < 0.05$  vs. PAA.**



### *III.6.3.3 Stoffwechselparameter im Gewebe*

Der Triglyzeridgehalt der Leber lag bei den obesen Kontrolltieren etwa doppelt so hoch wie bei den schlanken Ratten (Tabelle III-21). Die behandelten Gruppen wiesen einen zehnfach höheren Lipidgehalt der Leber auf, wobei zwischen der Rosiglitazon und der PAA-Gruppe kein signifikanter Unterschied vorhanden war. Das Triglyzerid in der Skelettmuskulatur war bei allen drei Gruppen signifikant erhöht im Vergleich zu den schlanken Kontrollen, wobei die Rosiglitazon-behandelten Tiere mit Abstand am meisten TG im Muskel aufwiesen.

Die hohen Lipidmengen in Leber und Muskulatur müssen zum einen in Relation zum jeweiligen Körpergewicht gesehen werden: die behandelten Ratten sind mit Abstand am schwergewichtigsten. Außerdem lagern obese ZDF Ratten generell mehr Lipid ein als ihre schlanken Geschwistertiere; die diabetischen unbehandelten Tiere mobilisieren aber bereits gespeicherte Lipide wieder als Energiesubstrat. PAA aktiviert PPAR $\alpha$  und steigert so die hepatische  $\beta$ -Oxidation; daher findet ein erhöhter Fettsäure-Flux aus der Peripherie in die Leber statt; dies könnte zu den hohen Lipidmengen in der Leber der PAA-behandelten Tiere beitragen. Rosiglitazon bewirkt per se eine Erhöhung der Gesamt-Fettmasse; diese Fettmasse wird vor allem im Fettgewebe, aber auch in allen anderen Geweben abgelagert.

Der Gesamtcholesteringehalt der Leber lag bei den obesen unbehandelten und bei den schlanken Ratten in etwa auf gleicher Höhe. Die Rosiglitazon-Gruppe wies eine signifikant höhere Menge an T-Cholesterin in der Leber auf als die Gruppen der obesen unbehandel-

ten sowie der mit PAA behandelten Tiere. Der Cholesteringehalt in der Leber lag bei den mit PAA behandelten Ratten signifikant niedriger als bei den anderen Gruppen. Das Gesamt-Cholesterin im Skelettmuskel lag bei den schlanken und den obesen unbehandelten sowie den mit PAA behandelten Tieren in etwa gleich hoch. Der Gehalt an T-Cholesterin war bei der Rosiglitazon-Gruppe im Vergleich zu den schlanken Kontrollen und zu den PAA-behandelten Tieren signifikant erhöht.

<b>Gruppe</b>	<b>Leber-TG (mg/g)</b>	<b>Muskel- TG (mg/g)</b>	<b>Leber-T- Chol. (mg/g)</b>	<b>Muskel-T- Chol. (mg/g)</b>
Kontrolle S	1.8 ± 0.2	7.0 ± 2.6	2.0 ± 0.1	0.4 ± 0.1
Kontrolle Ob	4.4 ± 0.8 *†#	33 ± 10 *†	1.9 ± 0.1 †#	0.5 ± 0.1
Rosiglitazon	28 ± 4 *	91 ± 14 *	2.3 ± 0.1	0.6 ± 0.1 *
PAA	32 ± 1 *	66 ± 14 *	1.6 ± 0.1 *†	0.5 ± 0.1 †

***Tabelle III-21 Triglyzerid- und Gesamtcholesteringehalt in Leber und Skelettmuskulatur der verschiedenen Gruppen im Alter von 22-24 Wochen: schlanke ZDF Ratten (Kontrolle S; n=7), obese ZDF Ratten (Kontrolle Ob; n=7), mit Rosiglitazon (n=6) bzw. PAA (n=5) behandelte obese ZDF Ratten. Werte sind Mittelwerte ± SEM. \*  $p < 0.05$  vs. schlanke Kontrollen; †  $p < 0.05$  vs. Rosiglitazon, #  $p < 0.05$  vs. PAA.***

#### *III.6.3.4 Glukose-Infusionsrate und freie Fettsäuren als Parameter der Insulinsensitivität*

Im Vergleich zu den insulinsensitiven schlanken Kontrolltieren wiesen die obesen unbehandelten Ratten im Glukose-Clamp-Versuch deutlich herabgesetzte Glukose-Infusionsraten auf (Abb.III-19). Sie

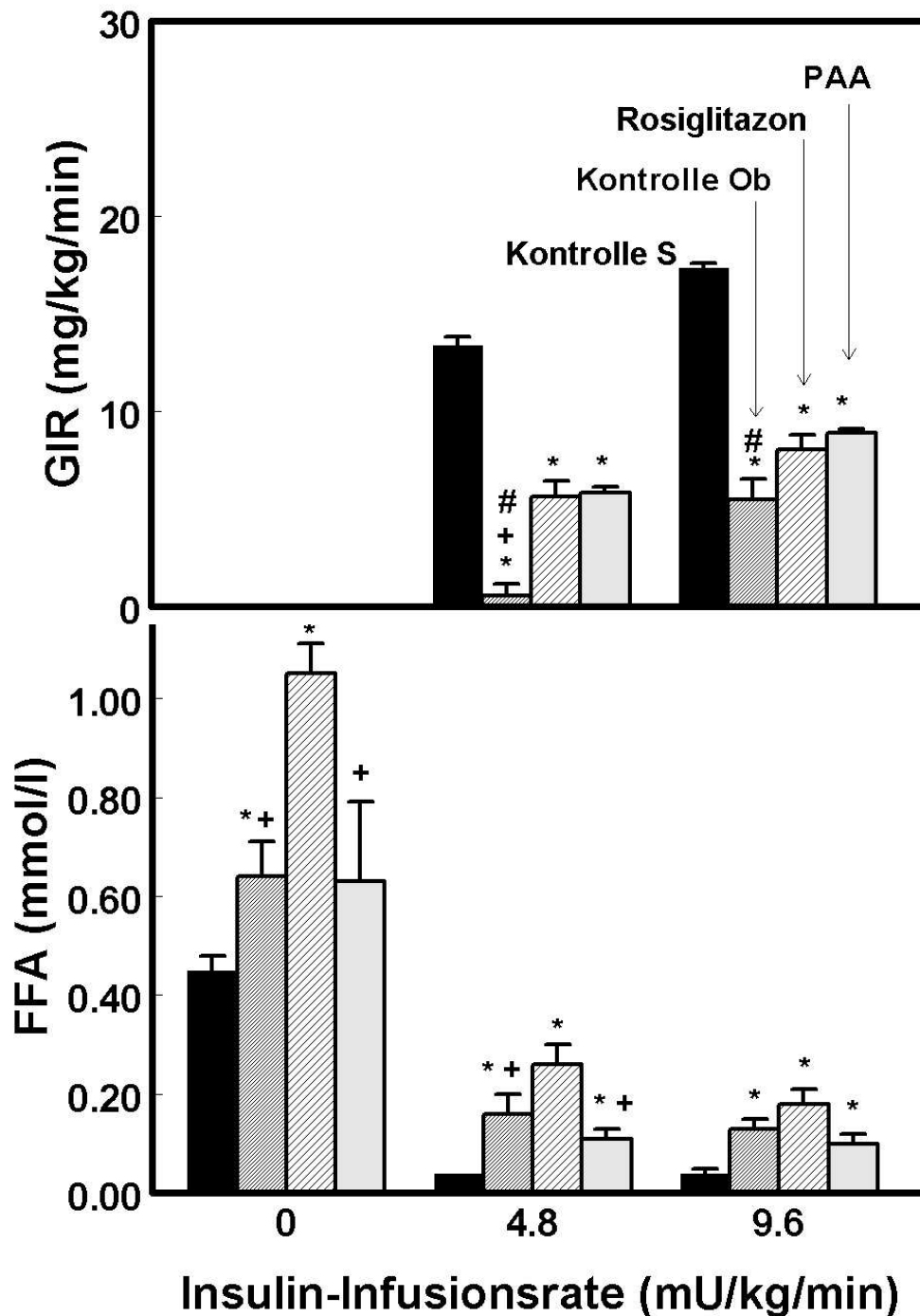
waren somit deutlich insulinresistenter als die schlanken Kontrollen. Bei den mit Rosiglitazon bzw. mit PAA behandelten obesen Tieren wurde bei der 4.8mU/kg/min-Insulin-Infusion im Vergleich zu den obesen Kontrollen eine signifikante Steigerung der GIR beobachtet, die in etwa der Hälfte der erforderlichen GIR der schlanken Tiere entsprach. Nach Gabe der 9.6mU/kg/min-Dosis stieg bei den behandelten Gruppen die GIR in geringem Ausmaß an, während sie sich bei den obesen Kontrollen verfünffachte. Die erforderliche GIR der PAA-Gruppe lag auch bei der 9.6mU/kg/min-Infusion signifikant über der GIR der obesen Kontrollen. Die GIR beider Gruppen behandelter Tiere entsprachen auch bei der hohen Insulindosis in etwa der halben erforderlichen GIR der schlanken Tiere. Die Behandlung konnte daher die Insulinsensitivität nur bis zu einem gewissen Grad verbessern; der maximale Effekt wurde bereits bei der 4.8mU/kg/min-Infusion beobachtet.

Im Altersvergleich hat die Insulinsensitivität der Tiere abgenommen: die 6 Wochen alten Ratten, ob schlank oder obese, reagierten deutlich sensibler auf die Insulin-Infusion (*Abb.III-9*) als die 22 bis 24 Wochen alten Tiere.

Die Plasmaspiegel freier Fettsäuren (FFA) wichen zwischen den einzelnen Gruppen deutlich voneinander ab (*Abb.III-19*). Die basalen FFA-Spiegel waren bei den obesen Kontrollen und den Rosiglitazon-behandelten obesen Tieren signifikant erhöht im Vergleich zu den schlanken Kontrollen, wobei die Plasma-FFA der Rosiglitazon-Gruppe fast doppelt so hoch lagen wie die der beiden anderen obesen Gruppen. Nach Gabe der ersten Insulin-Infusion (4.8mU/kg/min) wiesen alle Gruppen im Vergleich zu den schlanken Kontrollen signifikant erhöhte FFA-Spiegel auf, wobei die FFA-Spiegel der Rosiglita-

zon-Gruppe signifikant höher lagen als die der obesen unbehandelten und der mit PAA behandelten Tiere. Am Ende der 2. Insulin-Infusionsstufe (9.6mU/kg/min) waren die Plasma-FFA der obesen Kontrollen, der Rosiglitazon- und der PAA-behandelten obesen Tiere signifikant erhöht im Vergleich zu den schlanken Kontrollen. Die vergleichsweise hohen FFA-Spiegel der Rosiglitazon-behandelten ZDF Ratten trotz offensichtlich verbesserter Insulinsensitivität im Glukose-Clamp müssen im Kontext mit der extremen Adipositas der Tiere und dem damit verbundenen gesteigerten Lipid-Turnover gesehen werden. Bereits basal werden hohe Spiegel freier Fettsäuren gemessen; diese scheinen bei diesem Tiermodell mit einem gesteigerten Lipid-Metabolismus in unmittelbarem Zusammenhang zu stehen. Die vergleichsweise niedrigen FFA-Spiegel der obesen Kontrollen, die auf gleichem Niveau mit denen der PAA-Gruppe liegen, beruhen auf der katabolen Stoffwechselsituation dieser Tiere.

## Glukose-Infusionsrate und Plasmaspiegel freier Fettsäuren während des Glukose-Clamp-Versuchs



**Abb.III-19 Glukose-Infusionsrate und Plasmaspiegel freier Fettsäuren der verschiedenen Gruppen im Alter von 22-24 Wochen: schlanke ZDF Ratten (Kontrolle S; n=7), obese ZDF Ratten (Kontrolle Ob; n=7), mit Rosiglitazon (n=6) bzw. PAA (n=5) behandelte obese ZDF Ratten. Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  vs. schlanke Kontrollen; †  $p < 0.05$  vs. Rosiglitazon, #  $p < 0.05$  vs. PAA.**

### *III.6.3.5 IMCL-Bestimmung mittels MRS*

Am Vortag des Glukose-Clamp-Versuchs wurde abschließend der IMCL-Gehalt in der Skelettmuskulatur der ZDF Ratten gemessen.

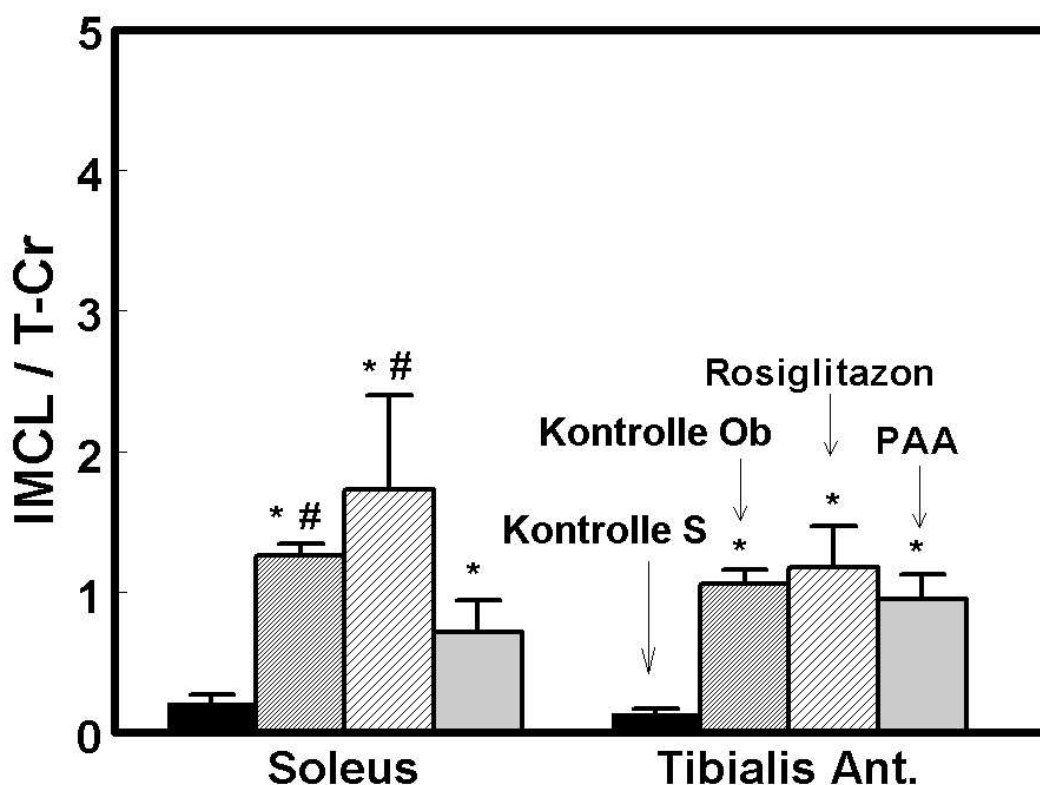
Der IMCL-Gehalt im M. Soleus der obesen behandelten und unbehandelten Ratten war gegenüber dem der schlanken Kontrolltiere signifikant erhöht (*Abb.III-20*). Dabei lagen die IMCL-Werte der obesen Kontrollen und der Rosiglitazon-Tiere signifikant über dem der PAA-Tiere.

Im M. Tibialis Anterior lag das IMCL tendenziell gleich hoch wie im M. Soleus, bei der obesen Kontroll- und der Rosiglitazon-Gruppe wurden etwas niedrigere IMCL-Werte als im anderen Muskel gemessen (*Abb.III-20*). Auch im M. Tibialis Anterior war der IMCL-Gehalt der obesen behandelten und unbehandelten Ratten signifikant erhöht im Vergleich zu den schlanken Tieren. Die obesen unbehandelten und sowie die behandelten Tieren wiesen in etwa gleich hohe IMCL-Werte auf.

Zunächst haben – absolut gesehen – die IMCL-Mengen über den Zeitverlauf hin abgenommen (vgl. *Abb.III-18*). Dies ist ein Altersphänomen. Offensichtlich weisen junge Ratten deutlich mehr IMCL in der Skelettmuskulatur auf als adulte. Weiterhin sinkt der IMCL-Gehalt gerade bei den obesen Kontrollen ab, obwohl sie weiterhin insulinresistent bleiben. Auch weisen sie kein höheres IMCL auf als die behandelten Ratten, sind aber insulinresistenter. Bei dieser Gruppe kommt ein weiteres Phänomen zum Tragen: im Alter von 22 bis 24 Wochen sind die Tiere bereits diabetisch; ihre Insulinresistenz im Glukose-Clamp ist daher nicht mehr eine primäre, womöglich in ursächlichem Zusammenhang mit dem IMCL stehende. Sie zeigen

vielmehr eine sekundäre, Hyperglykämie-induzierte Insulinresistenz im Rahmen des manifesten Diabetes, welche durchaus mit vergleichsweise niedrigen IMCL-Spiegeln einhergehen kann. Die entgleiste Stoffwechselsituation der Tiere mit Hyperglykämie, Hypoinsulinämie, Körpergewichtsverlust und Mobilisierung der Energiereserven muss somit bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden.

### IMCL-Gehalt des M. Soleus und des M. Tibialis Anterior nach viermonatiger Behandlung



**Abb.III-20 Intramyozelluläres Lipid im M. Soleus und im M. Tibialis Anterior der verschiedenen Gruppen im Alter von 22-24 Wochen am Vortag des Glukose-Clamp-Versuchs: schlanke ZDF Ratten (Kontrolle S; n=7), obese ZDF Ratten (Kontrolle Ob; n=7), mit Rosiglitazon (n=6) bzw. PAA (n=5) behandelte obese ZDF Ratten. Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  vs. schlanke Kontrollen, #  $p < 0.05$  vs. PAA.**

### *III.6.3.6 IMCL-Bestimmung mittels Mikroskopie*

Im M. Soleus der schlanken Kontrolltiere wurden einheitlich minimale Mengen an IMCL gefunden. Die Muskelproben der obesen unbehandelten und der obesen behandelten Tiere wiesen moderate Mengen an IMCL auf.

Im Gegensatz zur MRS-Bestimmung wurden somit mittels Mikroskopie keine eindeutigen Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen gefunden. Somit hat sich im Rahmen dieser Studie die MRS als die sensitivere Methode zur IMCL-Messung erwiesen.



### **IV Diskussion**

In den letzten Jahren wurde intensiv versucht, dem Phänomen der Insulinresistenz mit zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismen auf den Grund zu gehen. Im Rahmen dieser Untersuchungen wird heute ein ursächlicher Zusammenhang zwischen der exzessiven ektopischen Fettakkumulation im Skelettmuskel und dem Auftreten von Insulinresistenz, einem Haupt-Charakteristikum des Typ II Diabetes, diskutiert.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine Wechselbeziehung zwischen der Insulinresistenz und dem intramyozellulär abgelagerten Lipid am Tiermodell der Ratte aufzuzeigen.

#### **IV.1 In vivo Insulinwirkung bei verschiedenen Tiermodellen**

Vor dem Hintergrund eines möglichen Zusammenhangs zwischen Insulinresistenz und IMCL wurden Tiermodelle mit unterschiedlich ausgeprägter Insulinsensitivität ausgewählt. Zur Quantifizierung der Insulinsensitivität, definiert als Ganzkörper-Glukose-Utilisation, wurde die euglykämisch-hyperinsulinämische Glukose-Clamp-Technik angewandt (DeFronzo et al., 1979; Dobbins et al., 2001).

Beim Vergleich der im Glukose-Clamp-Versuch gemessenen Insulinempfindlichkeit sensitiver Wistar Ratten, resistenter Zucker Fatty (ZF) Ratten und diabetischer Zucker Diabetic Fatty (ZDF) Ratten erwiesen sich die Wistar Ratten als insulinempfindlichste Spezies.

Es konnte gezeigt werden, dass die Wistar Ratte als insulinsensitiver Organismus auf die Gabe von Insulin mit einer deutlich gesteigerten

Glukose-Verstoffwechslung (dargestellt durch eine hohe Glukose-Infusionsrate im Glukose-Clamp-Versuch) sowie einer supprimierten Lipolyse (dargestellt durch niedrige Plasmaspiegel freier Fettsäuren im Glukose-Clamp-Versuch) reagiert. Die antilipolytische Wirkung des Insulins führt gleichzeitig zum Absinken der Plasma-Glyzerol-Spiegel. Auch sinken die Triglyzeride im Plasma, da Insulin die Lipogenese in Fettgewebe und Leber stimuliert, also die Substratspeicherung anstelle der Mobilisierung fördert.

Als Tiermodelle für eine verminderte Insulinempfindlichkeit wurden die ZF und die ZDF Ratte ausgewählt. ZF Ratten, zuerst beschrieben von Zucker (1965), sind ein etabliertes Tiermodell für Insulinresistenz. Charakteristischerweise weisen sie einen Leptin-Rezeptor-Defekt („fa“-Mutation) auf. Liegt diese Gen-Mutation homozygot vor, so sind die Tiere hyperphag und werden extrem adipös (Upton et al., 1998; Apweiler & Freund, 1993). Sie bilden eine kompensatorische Hyperinsulinämie aus und vermeiden so das Auftreten einer Hyperglykämie. Daher bleiben sie zeitlebens insulinresistent, werden aber nicht diabetisch, und bieten sich ideal zum Studium insulinresistenter Zustände an (Karasik & Hattori, 1985; Terrettaz et al., 1983 und 1986).

Insulinresistente ZF Ratten reagieren deutlich abgeschwächt auf die Insulingabe: ihre Glukose-Utilisation liegt um ein Vielfaches niedriger als die der insulinsensitiven Wistar Ratten, die Plasmaspiegel freier Fettsäuren liegen höher; die antilipolytische Wirkung des Insulin ist verringert. Charakteristischerweise sind die Tiere adipös; sie weisen des Weiteren eine kompensatorische Hyperinsulinämie sowie eine ausgeprägte Hyperleptinämie auf. Die kompensatorische Hyperinsulinämie dient der Aufrechterhaltung der Euglykämie und ist

Ausdruck einer dauerhaft und massiv gesteigerten Sekretionsleistung des Pankreas. Die Hyperleptinämie der Tiere kann zum einen eine Konsequenz der Adipositas sein, sie könnte aber auch auf den charakteristischen Leptin-Rezeptor-Defekt der ZF Ratten zurückzuführen sein.

Die ZDF Ratte stammt von der ZF Ratte ab. Einzelne ZF Ratten, die spontan Hyperglykämie zeigten, wurden verpaart; die Nachkommen wurden mittels fortlaufender Inzucht weitergezüchtet. Neben der „fa“-Mutation im Leptin-Gen wird bei den ZDF Ratten ein weiterer, bislang unbekannter Gen-Defekt vermutet.

Im Unterschied zur ZF Ratte, die durch lebenslange kompensatorische Hyperinsulinämie das Auftreten einer Hyperglykämie und somit den Ausbruch des Diabetes umgeht, wird die männliche homozygote ZDF Ratte im Alter von 12 bis 14 Wochen spontan diabetisch. Männliche obese ZDF Ratten finden daher als Tiermodell für den Typ II Diabetes Verwendung. Als Ursache für den Übergang in das diabetische Stadium, einhergehend mit Hyperglykämie, Hyperlipidämie und Hypoinsulinämie, werden massive Lipidablagerungen in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas der Tiere diskutiert (Lee et al., 1994); diese führen zum  $\beta$ -Zell-Versagen („Lipotoxizität“). Weibliche obese ZDF Ratten stimmen in fast allen Charakteristika mit den männlichen überein. Sie sind ebenfalls insulinresistent; im Gegensatz zu ihren männlichen Geschwistertieren werden sie aber nicht diabetisch, solange sie mit einer Normaldiät gefüttert werden. Interessanterweise kann man die Manifestation des Diabetes bei den weiblichen obesen ZDF Ratten durch Fütterung einer fettreichen Diät induzieren (Corsetti et al., 2001). Man vermutet, dass die weiblichen Tiere in der Lage sind, hohe Lipidspiegel, sowohl zirkulierende als auch eingelagerte, zu kom-

pensieren, während die Toleranzschwelle bei den männlichen Geschwistertieren deutlich niedriger liegt. Daher wird bei den weiblichen Tieren kein spontaner Ausbruch des Diabetes beobachtet. Erst mit der Fütterung der Fettdiät wird die Toleranzschwelle überschritten; sie werden hyperglykämisch, hypoinsulinämisch und somit diabetisch. Somit würde die Verwendung weiblicher ZDF Ratten den Vorteil bieten, dass der Zeitpunkt der Diabetes-Manifestation steuerbar wäre.

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten männlichen ZDF Ratten zeigen wie die ZF Ratten eine deutlich verringerte Insulinsensitivität im Glukose-Clamp-Versuch: eine niedrige Glukose-Infusionsrate sowie erhöhte Spiegel freier Fettsäuren. Im Unterschied zur insulinresistenten, nicht-diabetischen ZF Ratte aber befinden sie sich in einer katabolen Stoffwechsellage. Diese ist gekennzeichnet durch eine massive Hyperglykämie, vergleichsweise niedrige Insulinspiegel (Erschöpfung der  $\beta$ -Zellen des Pankreas) sowie veränderte Lipid-Parameter (Stoffwechselentgleisung, Mobilisierung von Energiereserven) und ein zunächst stagnierendes, später gar abfallendes Körpergewicht. Die Insulinresistenz der diabetischen Tiere ist daher möglicherweise keine gänzlich primäre, Lipid-induzierte, sondern eine teilweise sekundäre, durch die Hyperglykämie hervorgerufene.

Im Rahmen dieser vergleichenden Studie wurde gezeigt, dass periphere Insulinresistenz funktionell im Glukose-Clamp nachgewiesen und auch quantifiziert werden kann. Die funktionelle Insulinresistenz manifestiert sich sowohl auf der Ebene des Glukose- als auch des Lipidstoffwechsels. Hierbei unterscheiden sich insulinresistente und diabetische Rattenmodelle insofern voneinander, als dass mit beginnendem Diabetes eine Dekompensation der Insulin-

sekretion mit Einfluss auf die Energiehomöostase auftritt (Zhou et al., 1999).

### **IV.2 Die Rolle des intramyozellulären Lipids**

Welche pathophysiologischen Mechanismen liegen der Insulinresistenz zugrunde? Sind in der Muskelzelle akkumulierte Lipide an der Entstehung beteiligt?

Um dieser Fragestellung nachzugehen, ist es von elementarer Bedeutung, IMCL nachweisen und quantifizieren zu können. In der vorliegenden Arbeit wurde das IMCL sowohl ex vivo mittels Mikroskopie als auch in vivo mittels MRS bestimmt. Auch wurde bei einem Teil der durchgeführten Studien der Triglyzeridgehalt im Skelettmuskel biochemisch bestimmt.

Das konventionelle Verfahren der biochemischen Analyse des Triglyzerids in der Muskulatur basiert auf der Chloroform-Methanol-Extraktion der Lipide (Bligh & Deyar, 1959) und gibt Aufschluss über den Gesamtgehalt an Lipid in der Muskelprobe. Eine Differenzierung zwischen IMCL und EMCL ist nicht möglich. Somit erlaubt diese Methode weder den eindeutigen Nachweis noch die Quantifizierung von IMCL. Auch kann vom Gesamt-Lipid-Gehalt kein Rückschluss auf den Grad der Insulinsensitivität gezogen werden (Szczepaniak et al., 1999; Dobbins et al., 2001).

Dies lässt sich konkret in der Fruktose-Studie an den Wistar Ratten zeigen. Die biochemische Analyse ergab keinen Unterschied zwischen dem Gesamt-Lipid-Gehalt in der Skelettmuskulatur der Fruktosegefütterten Ratten und dem der Kontrolltieren. Das mittels MRS im M. Soleus gemessene IMCL hingegen war bei der Fruktose-Gruppe

signifikant erhöht und korrelierte mit der im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant verminderten Insulinsensitivität.

Auch die ZDF Ratten-Studie demonstriert die fehlende Aussagekraft der biochemisch bestimmten Gesamt-Lipide hinsichtlich der Insulinsensitivität. Im Alter von 6 Wochen unterschieden sich die obesen ZDF Ratten im Gesamt-Lipid-Gehalt der Skelettmuskulatur nicht von ihren schlanken Artgenossen. Das IMCL der obesen Tieren war allerdings sowohl im M. Soleus als auch im M. Tibialis Anterior signifikant erhöht und korrelierte mit der ausgeprägten funktionellen Insulinresistenz im Glukose-Clamp-Versuch. Im Alter zwischen 22 und 24 Wochen zeigten die obesen unbehandelten und behandelten Ratten einen deutlich erhöhten Gesamt-Lipid-Gehalt der Skelettmuskulatur im Vergleich zu den schlanken Tieren. Die Rosiglitazon-behandelten obesen Tiere wiesen dabei ein dreimal höheres Gesamt-Lipid auf als die obesen Kontrollen. Im Glukose-Clamp-Versuch hingegen zeigte die Rosiglitazon-Gruppe eine deutlich verbesserte Insulinsensitivität im Vergleich zu den unbehandelten obesen Ratten. Es war somit nicht möglich, einen Rückschluss von der Menge an Gesamt-Lipid in der Skelettmuskelprobe auf den Grad der Insulinsensitivität zu ziehen.

Die Aussagekraft der biochemischen Lipid-Bestimmung beschränkt sich daher auf den Gesamt-Fettgehalt der Muskulatur. Die Quantifizierung des gesamten Lipids im Muskel kann Aufschluss geben über den Gesamt-Körperfettgehalt, nicht aber über die Menge an IMCL. Bei den infolge der Rosiglitazon-Behandlung extrem adipösen ZDF Ratten beispielsweise liegt die Gesamt-Lipid-Menge in der Skelettmuskulatur fünffach bzw. achtfach höher als bei den schlanken ZDF Ratten bzw. den schlanken Wistar Ratten. Die Menge an Gesamt-

Lipid in der Muskelprobe korreliert also offenbar zu einem gewissen Grad mit dem Körpergewicht, nicht aber mit der Insulinsensitivität.

Auch die mikroskopische Evaluation, wenngleich als Methode etabliert (Pan et al., 1997; He et al., 2001; Levin et al., 2001), hat ihre Grenzen in der Beurteilung des Gehaltes an IMCL. Zwar kann das Vorhandensein von IMCL qualitativ nachgewiesen werden, eine eindeutige Quantifizierung ist aber nicht möglich. Die morphometrische Bestimmung ist aufwendig, nicht exakt und weniger sensitiv als die magnetresonanzspektroskopische. Dies zeigt sich im Rahmen der ZDF Ratten-Studie: mikroskopisch ist kein eindeutiger Unterschied im IMCL-Gehalt bei den verschiedenen Gruppen detektierbar, während die MRS-Messung signifikante Unterschiede ergibt. Des Weiteren ist die Beschränkung auf die ex vivo Messung von Nachteil.

Im Gegensatz zu diesen herkömmlichen Methoden bietet die Magnetresonanzspektroskopie die Möglichkeit, den IMCL-Gehalt wiederholt, nicht-invasiv und in vivo zu messen.

Die magnetische Kernspinresonanz („Nuclear Magnetic Resonance“ / NMR) an kompakter Materie wurde 1946 in den USA entdeckt. Es handelt sich um ein Resonanzphänomen, das durch die sich in einem äußeren Magnetfeld befindlichen Spins der Atomkerne in Wechselwirkung mit einem Radiofrequenzfeld erzeugt wird (Bruker, 1983 und 1985; Franke, 1998).

Man nutzt dabei die Eigenschaft der Atomkerne, sich im Magnetfeld auszurichten. Viele Atomkerne besitzen einen Eigendrehimpuls oder Spin (= Eigenrotation des Kerns um eine feste Achse). Wird eine Substanz, die Kerne mit einem Spin enthält, in ein Magnetfeld gebracht, dann richten sich die magnetischen Kerndipole wie Kompassnadeln in Feldrichtung aus. Ein Proton beispielsweise kann sowohl parallel

als auch antiparallel zum äußeren Magnetfeld ausgerichtet sein. Die parallele Ausrichtung bedeutet geringere Energie  $E$  als die antiparallele, da man Arbeit aufbringen muss, um einen Magneten gegen das Feld zu drehen. Der Energieunterschied  $\Delta E$  ist proportional zur Magnetfeldstärke  $B_0$ , das heißt doppelte Magnetfeldstärke bedeutet doppelter Energieunterschied.

Als Summe der mikroskopischen magnetischen Dipolmomente bildet sich eine makroskopische Magnetisierung der Probe im Magnetfeld aus. Diese Magnetisierung ist mittels eines Resonanzexperimentes nachweisbar.

Über Einstrahlung eines Hochfrequenzimpulses der Frequenz  $\nu_0$  werden in einem konstanten Magnetfeld  $B_0$  Übergänge zwischen den Energieniveaus durch Absorption von elektromagnetischer Strahlung erzeugt. Die Frequenz muss exakt so sein, dass die Beziehung

$$\Delta E = h \times \nu_0 = h \times \gamma \times 2\pi^{-1} \times B_0$$

( $h$  = Planck'sches Wirkungsquantum) erfüllt ist .

Strahlt man also einen Hochfrequenzpuls der Frequenz  $\nu_0$  ein, so werden Übergänge zwischen den Energieniveaus durch Umklappen der Spinrichtung erzeugt.

Jede Atomkern-Art hat eine bestimmte gyromagnetische Konstante  $\gamma$  und damit eine charakteristische, eigene Resonanzfrequenz  $\nu_0$ . Wasserstoffkerne z.B. besitzen in einem 1.5 Tesla starken Magnetfeld eine Eigenfrequenz von 63.8MHz. Exakt diese Frequenz ist also nötig, um solche Kerne anzuregen. Da sie in biologischem Gewebe mit Abstand am häufigsten auftreten, ist ihr Resonanzsignal am intensivsten.



In biologischen Geweben liegen Kerne im Molekülverband vor. Dabei werden die Resonanzfrequenzen der einzelnen Kerne durch die Elektronenhülle der chemischen Bindung beeinflusst (unterschiedliche Abschirmung des äußeren statischen Magnetfeldes). Daraus resultiert, dass in einem Spektrum gleiche Kerne mit leicht voneinander verschiedenen Resonanzfrequenzen entsprechend ihrer chemischen Bindung zum Magnetresonanzsignal beitragen. Protonen in unterschiedlicher chemischer Bindung haben somit charakteristisch unterschiedliche Resonanzfrequenzen. Diese relative Frequenzänderung zwischen zwei Kernen wird als chemische Verschiebung  $\delta$  bezeichnet. Diese wird relativ zu einem internen oder externen Standard in Millionstel der Resonanzfrequenz (parts per million = ppm) angegeben.

Ein NMR-Gerät besteht im Prinzip aus einem Magneten, einem Impulsgenerator, einem Hochfrequenzsender, der Sende- und Empfangsspule und einem elektronischen Empfangssystem.

Ein zeitlich stabiles, homogenes Magnetfeld ist eine wesentliche Voraussetzung für den Magnetresonanz-Effekt. Höhere Feldstärken trennen die einzelnen Resonanzen besser, sie ergeben auch ein besseres Signal-/Rausch-Verhältnis („signal-to-noise-ratio“). In der analytischen NMR werden in kleineren Magneten Felder bis zu 19 Tesla erzeugt.

Die volumenselektive NMR-Spektroskopie bietet die Möglichkeit, Stoffwechselveränderungen am lebenden Organismus zu beobachten (Boesch, 1997). Zum Erhalten aussagekräftiger Ergebnisse müssen Einflüsse von Signalen außerhalb des „volume of interest“ vermieden werden.

Dies erfordert eine sichere Lokalisierung des Signals. Hierfür erfolgt die Positionierung des untersuchten Volumens anhand mehrerer Bilder in unterschiedlichen Raumrichtungen.

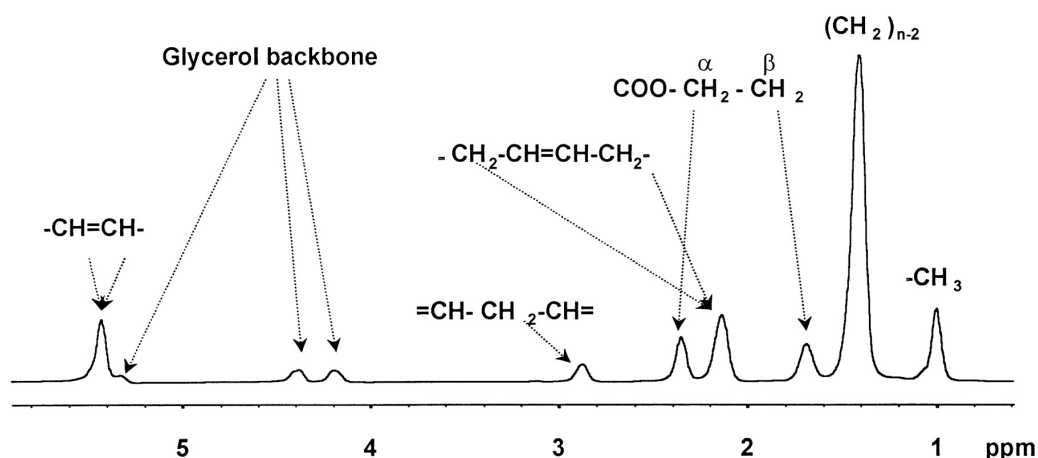
Mittels Magnetfeldgradienten, d.h. räumlich unterschiedlichen Magnetfeldstärken, können Volumina auch in der Tiefe ausgewählt werden. Dabei existieren verschiedenste Techniken und Kombinationen, wie die Gradienten eingesetzt werden. Das minimale Volumen ist allerdings durch die Signalausbeute beschränkt. Außerdem kann das Signal mit sogenannten „Oberflächenspulen“ durch die räumlich begrenzte Empfindlichkeit der Aufnahme-Antenne auf die direkte Umgebung der Spule begrenzt werden.

Die Signale („Resonanzen“) in den Spektren von Wasserstoff ( $^1\text{H}$ , Proton) verteilen sich über einen Bereich von etwa 10ppm, wobei sie ohne besondere Aufnahmetechnik durch das starke Wassersignal dominiert sind. Es besteht die Möglichkeit, durch spezielle Aufnahmesequenzen das Wassersignal zu unterdrücken. Dann werden auch wesentlich schwächere Signale sichtbar, wie zum Beispiel die der intramyozellulären Lipide.

Die  $^1\text{H}$ -MR-Spektroskopie bietet die Möglichkeit zur nicht-invasiven Bestimmung der muskulären Lipide mit Differenzierung der Anteile von IMCL und dem Fett in den Adipozyten (Schick et al., 1993; Brechtel et al., 1999).

Die Protonen-Signale, die man von den Fettsäureketten der Triglyceride erhält, stellen Signale der Methylengruppen dar (siehe *Abb.IV-1*).

## Charakteristisches Lipid-Protonenspektrum



**Abb.IV-1 Die Protonensignale von Sojaöl. Die Resonanzen werden den Protonen der Fettsäureketten und des Glycerols zugeordnet; als Referenz dient hier das Methyl-(CH<sub>3</sub>-)Signal bei 1.0ppm (nach Szczepaniak et al., 1999).**

In verschiedenen Studien wurde die Bedeutung der einzelnen Peaks des Fettspektrums untersucht. Bei der MRS-Untersuchung intrahepatischer Lipide (d.h. bei Abwesenheit von Adipozyten) beispielsweise erhält man ein einzelnes, charakteristisches Methylen-signal bei 1.4ppm (Hazle et al., 1990; Longo et al., 1993). Ein typisches Spektrum der Skelettmuskulatur hingegen zeigt Signale bei 1.4 und 1.6ppm (Schick et al., 1993; Boesch et al., 1997).

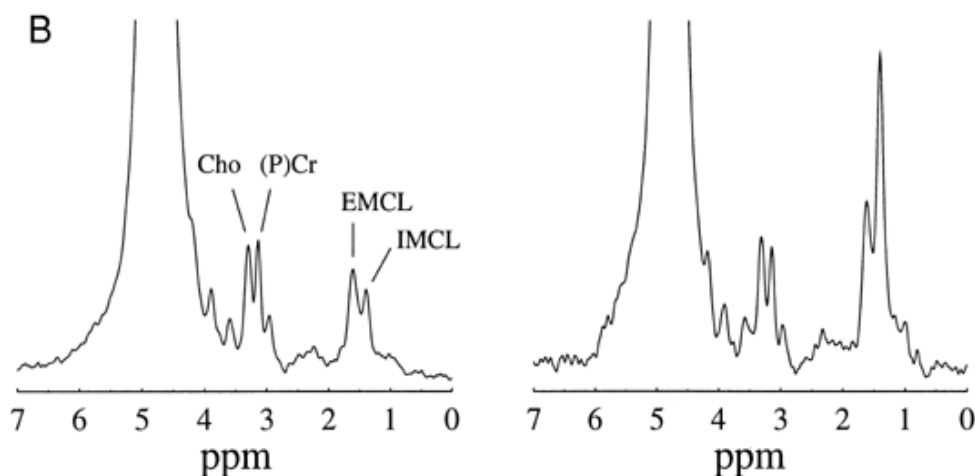
Des Weiteren wurden <sup>1</sup>H-Spektren vom Muskel lipodystrophischer Probanden aufgenommen. Patienten mit kongenitaler Lipodystrophie besitzen kein Fettgewebe. Mittels MRS-Messung konnte man bei ihnen lediglich ein Signal bei 1.4ppm detektieren, bei 1.6ppm war kein Protonensignal nachweisbar (Szczepaniak et al., 1999).

Man schlussfolgerte daraus, dass das Methylen-signal bei 1.6ppm charakteristisch für Fett in den Adipozyten ist, wohingegen das bei 1.4ppm auf Fett in Nicht-Adipozyten, wie Muskel- und Leberzellen, zurückzuführen ist.

Diese Frequenzverschiebung der beiden Fettsignale erklärt man mittels auftretender Suszeptibilitätseffekte aufgrund verschiedener geometrischer Anordnung der Fettkompartimente, welche die genannte Differenzierung ermöglichen (Schick et al., 1993; Kreis & Boesch, 1996; Boesch et al., 1997). Findet man intramyozelluläre Fette elektronenmikroskopisch eher als kugelförmige Droplets vor, so ordnen sich extrazellulär gelegene vielmehr parallel zur Muskelfaserrichtung in Schichten an.

Damit verhält sich das EMCL im Magnetfeld wie die Fasern selbst, und die EMCL-Signalfrequenz ist abhängig von der Ausrichtung zum Magnetfeld. Die IMCL-Signalfrequenz hingegen ist richtungsunabhängig, da die Droplets sich aufgrund ihrer sphärischen Struktur unabhängig von der Richtung des Magnetfeldes verhalten. Daraus resultiert, dass das EMCL-Kompartiment bei paralleler Faserausrichtung zu  $B_0$  als Signal bei 1.6ppm erscheint, während das IMCL-Signal bei 1.4ppm zu finden ist (siehe *Abb.IV-2*).

## Protonenspektren der Skelettmuskulatur



**Abb.IV-2 Protonenspektren des M. Tibialis Anterior.** Hier werden IMCL- und EMCL-Signale (intra- bzw. extramyozelluläres Lipid) eines gesunden (linkes Spektrum) und eines insulinresistenten Probanden (rechtes Spektrum) dargestellt; beim insulinresistenten Probanden ist das IMCL-Signal deutlich größer; Cho – Cholin, (P)Cr – (Phospho)Creatin (nach Jacob et al., 1999).

Als interne Referenz zur Skalierung der chemischen Verschiebung und der Signalintensitäten dient häufig das Methyl-Signal von Total-Creatin (tCr) bei 3.05ppm. Die Creatinkonzentration ist innerhalb einer Muskelgruppe gleichmäßig verteilt und offenbar von der Insulinsensitivität unabhängig, allerdings wurden vom Muskeltyp abhängige Konzentrationen berichtet (Bottomley et al., 1997).

Am Menschen wurde bereits gezeigt, dass das IMCL mittels MRS in vivo zu bestimmen ist (Krssak et al., 1999; Brechtel et al., 1999; Jacob et al., 1999; Perseghin et al., 1999). Ebenso gibt es veröffentlichte Arbeiten über in vivo Messungen an Hunden und Kaninchen (Szcepaniak et al., 1999). Am Tiermodell der Ratte hingegen wird hauptsächlich von Messungen am isolierten Muskel berichtet (Dobbins et

al., 2001); eine von Ntziachristos et al. 1997 veröffentlichte Studie wurde zwar an anästhesierten Ratten durchgeführt, konzentriert sich aber hinsichtlich der Fragestellung auf generelle Unterschiede zwischen in vivo und post mortem gemessenen Muskel-Spektren.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden erstmals nicht-invasive in vivo IMCL-Messungen mittels MRS an der narkotisierten Ratte durchgeführt. Zum Teil wurde einmalig am Vortag des Glukose Clamp gemessen, zum Teil wiederholt im Rahmen der chronischen Behandlung mit Substanzen, von denen eine Verbesserung der Insulinsensitivität erwartet wurde.

Bislang veröffentlichte MRS-Studien über IMCL wurden an 1.5Tesla- (Schick et al., 1993; Szczepaniak et al., 1999), 2.1Tesla- (Krssak et al., 1999) oder 4.7Tesla-Systemen (Ntziachristos et al., 1997; Dobbins et al., 2001) durchgeführt. Die IMCL-Messungen im Rahmen dieser Dissertation erfolgten hingegen an einem 7Tesla-Gerät (vgl. II.8). Höhere Feldstärken trennen die einzelnen Resonanzen besser, sie ergeben ein besseres Signal-/Rausch-Verhältnis („signal-to-noise-ratio“). Die hohe Feldstärke von 7Tesla ermöglicht es, sehr kleine Volumina (bis 2mm Kantenlänge) auch in der Tiefe des Muskels auszuwählen und dort rauscharme, reproduzierbare Spektren mit eindeutig zuzuordnenden IMCL-Signalen aufzunehmen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die MRS-Messungen sowohl im M. Soleus als auch im M. Tibialis Anterior durchgeführt. Der M. Soleus ist ein oxidativer, mitochondrienreicher „slow-twitch“ Typ I-Muskel, der M. Tibialis Anterior ist ein glykolytischer „fast-twitch“ Typ IIa-Muskel (Schmalbruch, 1971; Armstrong & Phelps, 1984; Song et al., 1999).

In der Literatur wird sowohl von IMCL-Messungen im M. Soleus (Schick et al., 1993; Krssak et al., 1999; Dobbins et al., 2001) als auch von IMCL-Messungen im M. Tibialis Anterior (Szczepaniak et al., 1999) berichtet. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erwiesen sich die Messungen in beiden Muskeln als aussagekräftig im Hinblick auf einen Zusammenhang zwischen IMCL und Insulinsensitivität.

Im Hinblick auf zukünftige Studien wird jedoch die bevorzugte Messung des IMCL im M. Tibialis Anterior erwogen. Dies lässt sich mit den metabolischen Eigenschaften der Muskeltypen begründen. Typ I-Muskelfasern haben generell einen höheren Lipidgehalt, weisen gleichzeitig aber auch eine höhere oxidative Enzym-Kapazität, höhere Raten der FS-Aufnahme sowie eine größere Empfindlichkeit hinsichtlich des insulinvermittelten Glukosetransports auf. Das Vorhandensein von Lipid im Skelettmuskel muss daher nicht zwangsläufig fatal sein - solange es in einem Muskel auftritt, der die metabolische Kapazität für eine effiziente Lipid-Verstoffwechslung besitzt (Kelley & Mandarino, 2000). Dies trifft für den oxidativen M. Soleus, der vorwiegend aus Typ I-Fasern besteht, zu. Der M. Tibialis Anterior hingegen, ein vorwiegend aus Typ II-Fasern zusammengesetzter glykolytischer Muskel, gewinnt Energie aus der Verstoffwechslung von Glukose. Vermehrt in der Muskelzelle vorhandenes Lipid kann von diesem Muskeltyp nicht in dem Maß metabolisiert werden und akkumuliert folglich. Somit hätte der Nachweis einer erhöhten Lipidkonzentration in den Myozyten des glykolytischen, nicht auf Lipid-Oxidation ausgerichteten M. Tibialis Anterior eine weitaus größere Aussagekraft hinsichtlich des Vorhandenseins von Insulinresistenz.

Ein klarer Vorteil der MRS ist die Wiederholbarkeit der Messungen, die eine Observation des IMCL-Gehaltes über einen bestimmten Zeit-

raum ermöglicht. Auch können mögliche Effekte einer pharmakologischen Intervention auf den IMCL-Gehalt geprüft und nachgewiesen werden.

Die finale IMCL-Messung am Vortag des Glukose-Clamp-Versuchs erlaubt schließlich den Vergleich des IMCL-Gehalts mit der im Glukose-Clamp-Versuch gemessenen funktionellen Insulinsensitivität.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das IMCL sowohl mittels Mikroskopie als auch mittels MRS gemessen, wobei letztere Methode die überlegene darstellte. Gerade die ZDF Ratten-Studien demonstrieren, dass mittels MRS signifikante Unterschiede im IMCL-Gehalt zwischen schlanken, obesen unbehandelten und obesen behandelten Tieren aufgezeigt werden können, während mittels Mikroskopie bei denselben Tieren keine eindeutigen Unterschiede feststellbar sind.

Die durchgeführten Studien gaben außerdem deutliche Hinweise auf einen engen Zusammenhang zwischen erhöhtem IMCL und dem Vorhandensein von Insulinresistenz.

Schlanke und obese ZDF Ratten beispielsweise unterschieden sich im IMCL-Gehalt sowohl des M. Soleus als auch des M. Tibialis Anterior eindeutig voneinander. Die longitudinale Messung des IMCL (vgl. III.5) ergab über den Zeitverlauf deutlich höhere IMCL-Spiegel bei den obesen Tieren als bei den schlanken Wurfgeschwistern. Dabei war kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Muskeltypen feststellbar. Im Verlauf der Studie war sowohl im M. Soleus als auch im M. Tibialis Anterior eine Abnahme des IMCL-Gehalts bei den schlanken als auch bei den obesen Tieren zu beobachten. Bei den schlanken Ratten erschien der IMCL-Rückgang vergleichsweise geradlinig und könnte daher ein altersabhängiges Phänomen darstel-



len. Die obesen ZDF Ratten zeigten vor allem ab einem Lebensalter von etwa 18 Wochen einen drastischen IMCL-Schwund, was auf die katabole Stoffwechselsituation der zu diesem Zeitpunkt bereits diabetischen Tiere zurückzuführen sein könnte.

Die obesen ZDF Ratten wiesen im Alter von 6 Wochen einen dreifach höheren IMCL-Gehalt in beiden Muskeln auf als ihre schlanken Geschwister. Dieser korrespondierte mit der ausgeprägten Insulinresistenz der obesen Tiere im Vergleich zu den insulinsensitiven schlanken ZDF Ratten. Auch bei ZDF Ratten im Alter von 24 Wochen wurden IMCL und Insulinsensitivität gemessen. Wiederum korrelierte ein hoher IMCL-Wert bei den obesen ZDF Ratten mit einer deutlichen Insulinresistenz.

Ein Zusammenhang zwischen IMCL-Gehalt und Insulinempfindlichkeit konnte also gezeigt werden.

Nun stellte sich die Frage, ob die Verbindung zwischen IMCL und Insulinresistenz von pathogenetischer Bedeutung sein könnte. Es wurde versucht, bei insulinsensitiven Ratten Insulinresistenz zu induzieren sowie bei insulinresistenten Ratten durch pharmakologische Intervention eine Insulinsensitivitätssteigerung zu erreichen.

### **IV.3 Induktion der Insulinresistenz**

Wie entsteht nun Insulinresistenz? Kann man Insulinresistenz bei insulinsensitiven Ratten auslösen? Sind in diesem Fall Lipide an der Entstehung beteiligt?

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Modell der „Fruktose-induzierten Insulinresistenz“ gewählt.

Dass Nährstoffe einen maßgeblichen Einfluss auf die Insulinwirkung haben und so zur Entwicklung von Insulinresistenz und Typ II Diabetes beitragen können, ist bekannt (Hamman, 1992). Ratten werden beispielsweise durch Fütterung einer Fett-Diät insulinresistent (Storlien et al., 1991). Auch eine Saccharose-Diät induziert Insulinresistenz (Storlien et al., 1988; Pagliassotti et al., 2000). Das Disaccharid Saccharose besteht aus je einem Molekül Glukose und Fruktose, wobei die Fruktose die Insulinresistenz-induzierende Komponente zu sein scheint (Reiser et al., 1987; Thorburn et al., 1989; Thresher et al., 2000).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte tendenziell die Abnahme der Insulinsensitivität nach Fütterung einer Fruktose-Diät demonstriert werden. Die Glukose-Utilisation war bei den Fruktose-gefütterten Tieren im Vergleich zu den Kontrollen vermindert.

Als möglichen Mechanismus dieser Fruktose-induzierten Insulinresistenz diskutiert man eine Interferenz der Fruktose mit dem Lipidstoffwechsel. Fruktose hemmt das Enzym Phospho-Glyzerol-Dehydrogenase, wodurch Glyzerol-3-Phosphat, ein Vorläufer der Lipidsynthese, ansteigt (Thorburn et al., 1989). Erhöhte Glyzerol-3-Phosphat-Spiegel führen zu einer gesteigerten Triglyzeridsynthese.

Eine vermehrte Lipidsynthese bedeutet ein erhöhtes Angebot an Lipiden, die sowohl zirkulieren (Hypertriglyzeridämie) als auch gespeichert werden.

Im Gegensatz zu anderen Studien (Zavaroni et al., 1982; Thorburn et al., 1989; Thresher et al., 2000; Chen et al., 2001) wurde im Rahmen dieser Studie ein Effekt der Fruktose-Diät auf die Plasma-Triglyzeridspiegel nur im gefütterten Zustand beobachtet. Im Rahmen des Glukose-Clamp-Versuchs war kein Unterschied in der Plas-

ma-TG-Konzentration zwischen der Kontrollgruppe und der Fruktose-gefütterten Gruppe zu erkennen. Dies könnte damit erklärt werden, dass der Glukose-Clamp-Versuch an über Nacht gehungerten Tieren durchgeführt wurde.

Des weiteren wird von Thorburn et al. (1989) berichtet, dass auch eine vergleichsweise geringe Erhöhung der Triglyzeridspiegel ausreicht, um die Insulinwirkung merklich zu beeinträchtigen. Dies war bei der vorliegenden Studie vermutlich der Fall: eine Erhöhung der Triglyzeridspiegel war lediglich im gefütterten Zustand nachweisbar, reichte aber offensichtlich aus, um sowohl eine Zunahme des IMCL als auch eine Abnahme der Insulinsensitivität zu bewirken.

Im Rahmen der MRS-Messung wiesen die Fruktose-gefütterten Ratten deutlich mehr IMCL im M. Soleus auf. Dies stimmt zum einen mit dem vermuteten Mechanismus der Fruktose-induzierten Insulinresistenz überein: Fruktosefütterung führt zu vermehrter Lipidsynthese, und dieses Mehr an Lipiden könnte in der Skelettmuskulatur eingelagert werden. Zum anderen korreliert die herabgesetzte Insulinsensitivität im Glukose-Clamp mit dem erhöhten IMCL-Gehalt.

Zusammenfassend lässt sich zeigen, dass die Fütterung insulinsensitiver Wistar Ratten mit einer Fruktose-Diät sowohl zum Auftreten von Insulinresistenz als auch zu einem erhöhten IMCL-Gehalt im Skelettmuskel führt. Zur Zeit läuft eine weitere Studie an Wistar Ratten, die mit einer Fruktose-Diät gefüttert werden. Durch eine längere Fütterungsperiode sowie eine optimierte Futterzubereitung soll versucht werden, einen noch ausgeprägteren Anstieg sowohl der Plasma-Triglyzeride als auch des IMCL zu induzieren und diesen dann mit einer deutlichen Insulinresistenz zu korrelieren.

### **IV.4 Pharmakologische Beeinflussung der Insulinresistenz**

Kann umgekehrt bei insulinresistenten Ratten durch pharmakologische Intervention eine Insulinsensitivitätssteigerung erreicht werden? Kann auch hier eine Beteiligung intramyozellulärer Lipide nachgewiesen werden?

Die über 3 Wochen mit dem „Insulin-Sensitizer“ Rosiglitazon behandelten insulinresistenten ZF Ratten zeigten neben einer hochgradigen Verbesserung der Insulinsensitivität im Glukose-Clamp-Versuch auch eine deutliche Abnahme des IMCL im M. Soleus. Dieser ausgeprägte Effekt sowohl auf die Insulinresistenz als auch auf das IMCL lässt auf eine Verbindung zwischen ektopisch akkumuliertem Lipid und Insulinresistenz schließen.

Des weiteren wurden durch die Rosiglitazon-Behandlung Glukose-, Triglyzerid-, FFA- und Insulinspiegel gesenkt, während Glyzerol anstieg. Diese Effekte auf die Glukose- und Lipid-Homöostase lassen sich mit der Rosiglitazon-vermittelten Induktion der Lipoprotein Lipase sowie bestimmter Fettsäure-Transporter-Proteine erklären. Interessant erscheint hierbei die Dissoziation der in der Regel in Korrelation stehenden Parameter Glyzerol und FFA. Rosiglitazon senkt die TG und die FFA, erhöht aber die Glyzerolspiegel drastisch. Dieses Phänomen lässt sich mit einer Rosiglitazon-vermittelten verstärkten intravasalen Lipolyse (LPL-Induktion) sowie einer verstärkten Aufnahme der freien Fettsäuren in die Gewebe erklären.

Infolge der Rosiglitazon-Behandlung waren die Plasma-Leptin-Spiegel der Ratten deutlich erhöht. Im Gegensatz dazu berichten Ye et al. (2001) nach Behandlung von Ratten mit Pioglitazon, einem weiteren Thiazolidindion, über ein Absinken des Plasma-Leptins. Diese

Abnahme erklärt man mit der TZD-vermittelten Repression der Leptin-Gen-Expression (Spiegelman, 1998).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde bei den mit Rosiglitazon behandelten Ratten eine extreme Körpergewichtszunahme beobachtet. Die Tiere wurden infolge der chronischen Behandlung mit dem „Insulin-Sensitizer“ deutlich schwergewichtiger als die unbehandelten Kontrollen. Der beobachtete Anstieg der Plasma-Leptin-Spiegel nach der Rosiglitazon-Behandlung könnte nun möglicherweise auf die extreme Adipositas der Tiere zurückzuführen sein. Die Behandlung mit Pioglitazon führte nämlich im Gegensatz dazu nicht zu einer solch ausgeprägten Fettleibigkeit der Ratten (Ye et al., 2001). Es erscheint außerdem möglich, dass Rosiglitazon im Rahmen der PPAR-vermittelten Modulation der Genexpression im Vergleich zu Pioglitazon einzelne Gene vermehrt oder vermindert aktiviert und so leicht divergente Effekte auf diverse Stoffwechselfparameter ausübt.

Als spezifischer Wirkmechanismus des zur Familie der Thiazolidindione gehörenden Rosiglitazon konnte eine Umgestaltung des Fettgewebes hin zu kleineren, insulinsensitiveren Adipozyten nachgewiesen werden (Okuno et al., 1998; DeSouza et al., 2001). Die Zahl der Adipozyten und somit die Masse des Fettgewebes nehmen zu; diese kleinen Adipozyten sind jedoch insulinsensitiver als die großen, was sich in einer verringerten FFA-Freisetzung (antilipolytische Wirkung des Insulins) sowie einer vermehrten Um- und Einlagerung von Speicherlipid in die Adipozyten (Lipogenese-Wirkung des Insulins) widerspiegelt.

Die im Rahmen dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Verbesserung der Insulinsensitivität infolge der Rosiglitazon-Behandlung auf seinen Wirkmechanismus der Fettzell differen-

zierung zurückzuführen ist. Die Insulinsensitivität als Funktion hauptsächlich der Skelettmuskulatur wird offenbar durch die Rosiglitazon-vermittelte Umverteilung der Lipide aus den Nicht-Adipozyten zurück in die Fettdepots verbessert.

Auch im Rahmen der akuten Behandlung von ZF Ratten mit dem selektiven, fettzellspezifischen Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptor-Agonist ARA wurde im Glukose-Clamp-Versuch eine deutliche Verbesserung der Insulinresistenz beobachtet. Im Plasma sanken die Spiegel freier Fettsäuren, des Glyzerols und der Triglyzeride. Auch die Insulinspiegel nahmen ab. Allerdings konnte keine gleichzeitige Abnahme des IMCL-Gehaltes nachgewiesen werden.

ARA wurde im Gegensatz zu den über Wochen über das Futter gegebenen PPAR-Agonisten akut verabreicht. Die akute Gabe bewirkte zwar eine Steigerung der Insulinsensitivität, tangierte aber nicht das in der Skelettmuskulatur gespeicherte IMCL.

Es ist bekannt, dass Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptor-Agonisten die Lipolyse in den Adipozyten hemmen und so die Freisetzung freier Fettsäuren inhibieren. Eine verringerte Bereitstellung freier Fettsäuren fördert die Verstoffwechslung von Glukose und führt zu einer Verbesserung der Insulinsensitivität (Foley, 1994; Qu et al., 1997). Allerdings hat dieser kurzfristige Effekt auf die Insulinsensitivität keine Auswirkung auf das IMCL. Dies könnte daran liegen, dass die IMCL-Speicher sich nur durch eine längerfristige pharmakologische Intervention beeinflussen lassen. Um eine Wirkung auf das IMCL beobachten zu können, müsste der Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptor-Agonist nicht - wie in der vorliegenden Studie - akut, sondern wiederholt und über einen längeren Zeitraum verabreicht werden.

Auch die PPAR-vermittelte Steigerung der Insulinsensitivität lässt sich nur nach chronischer Gabe der Substanzen demonstrieren. Der nachgewiesene Wirkmechanismus der veränderten Gentranskription (Induktion von Enzymen, Zelldifferenzierung) ist ein Langzeit-Effekt und erfordert daher eine mehrtägige Behandlung. In der Literatur werden Effekte in der Regel nach 3-4 Tagen Behandlung beschrieben (Olefsky, 2000; Minnich et al., 2001). Zwar gibt es auch Berichte über schnelle Effekte der PPAR-Agonisten auf die Glukose-Verstoffwechslung (Lee & Olefsky, 1995), es bleibt aber unklar, ob hierfür der PPAR-Mechanismus der veränderten Genexpression verantwortlich gemacht werden kann (Olefsky, 2000).

Die Ergebnisse weisen zweifelsohne darauf hin, dass ein Zusammenhang zwischen IMCL und Insulinresistenz besteht. Diese Wechselbeziehung stellt eine Facette des komplexen Phänomens der Insulinresistenz dar; ohne Zweifel sind aber weitere Faktoren bei der Entstehung der Insulinresistenz von Bedeutung (Hamman, 1992; Kahn & Flier, 2000; Saltiel, 2001).

Vor dem Hintergrund dieser komplexen Problematik wurden obese und schlanke männliche ZDF Ratten in einer Langzeit-Studie hinsichtlich ihrer Insulinsensitivität und parallel hinsichtlich ihres IMCL-Gehaltes untersucht. Ein Teil der obesen ZDF-Ratten wurde mit dem „Insulin-Sensitizer“ Rosiglitazon sowie mit dem PPAR $\alpha$ -Agonisten PAA behandelt.

Die Studie zeigt, dass sich obese normoglykämische ZDF Ratten bereits im Alter von 6 bis 8 Wochen deutlich von ihren schlanken Geschwistertieren unterscheiden. Neben deutlich höheren Triglyzerid-, FFA- und Glyzerolspiegeln sind auch die Insulin- und Leptinwerte der obesen Tiere markant erhöht. Die Blutglukose unterscheidet sich

hingegen nicht von den schlanken Kontrollen. Eine funktionelle Insulinresistenz sowie erhöhtes IMCL im Skelettmuskel werden bei den obesen Ratten beobachtet.

Des weiteren schreiten die obesen ZDF Ratten im Alter von 12 bis 14 Wochen von einem insulinresistenten Zustand, gekennzeichnet durch erhöhte Plasma-Triglyzeride, physiologische Blutglukose-Spiegel und eine kompensatorische Hyperinsulinämie, fort in ein offenkundig diabetisches Stadium, welches einhergeht mit Hyperglykämie und fallenden Insulinspiegeln. Infolge der Hyperglykämie treten nach der 13. Lebenswoche Glukosurie und Mikroalbuminurie auf. Die Hypertriglyzeridämie verstärkt sich deutlich. Interessanterweise stagniert bei den obesen ZDF Ratten die Körpergewichtszunahme ab der 15. Lebenswoche; im Alter von 22 Wochen beginnt das Körpergewicht abzufallen.

Die erhobenen Laborparameter deuten mit dem Übergang in das Stadium des manifesten Diabetes im Alter von etwa 14 Wochen übereinstimmend auf eine katabole Stoffwechselsituation der obesen Ratten hin. Die Tiere verlieren Proteine und Glukose über den Urin, die Nierenfunktion ist eingeschränkt. Sie büßen an Gewicht ein, da begonnen wird, körpereigene Nährstoffreserven wie Fettdepots zu mobilisieren. Das Pankreas, das aufgrund massiver Lipideinlagerungen bereits vorgeschädigt ist („Lipotoxizität“), ist der ausgeprägten Hyperglykämie nicht gewachsen, die  $\beta$ -Zellen gehen zugrunde.

Im Glukose-Clamp-Versuch erweisen sich die Tiere als ausgesprochen insulinresistent im Vergleich zu den schlanken Kontrollen. Das IMCL liegt bei ihnen deutlich höher als bei den schlanken Tieren. Somit ist der Zusammenhang zwischen Insulinresistenz und IMCL auch im Alter von 24 Wochen sichtbar.



Bei der parallel durchgeführten Langzeitbehandlung obeses ZDF Ratten mit einem PPAR $\gamma$ - (Rosiglitazon) bzw. einem PPAR $\alpha$ -Agonisten (PAA) wurde gezeigt, dass der Ausbruch des Typ II Diabetes verhindert werden kann. Die Diabetes-Prävention ließ sich an diversen Parametern deutlich demonstrieren: die Blutglukose blieb auf physiologischem Niveau, entsprechend dem der schlanken Kontrollen. Die mit 6 Wochen Lebensalter markant ausgeprägte Hypertriglyzeridämie verbesserte sich über den Zeitraum der Behandlung, ebenso die Hyperinsulinämie. Die Nierenfunktion blieb intakt. Die Körpergewichtsentwicklung der behandelten Tiere verlief annähernd linear; es wurde im Unterschied zu den obesen Kontrollen im Verlauf der Studie keine Stagnation oder gar Abnahme beobachtet.

Die behandelten Tiere erreichten indes nicht die metabolischen Charakteristika der schlanken Kontrollratten. Auch hinsichtlich der Insulinsensitivität konnte bei beiden Gruppen im Rahmen der Behandlung zwar eine deutliche Verbesserung der Glukose-Infusionsrate beobachtet werden, jedoch nicht auf das Niveau der schlanken Kontrollen.

Der IMCL-Gehalt im Muskel der behandelten Tiere unterschied sich im Alter von 16 Wochen deutlich, im Alter von 24 Wochen hingegen kaum noch von dem der obesen Kontrollen, wobei die PAA-Gruppe tendenziell niedrigere IMCL-Werte aufwies als die Rosiglitazon-Gruppe.

Die chronische Behandlung von ZDF Ratten mit Rosiglitazon bzw. mit PAA verbessert somit diverse Parameter des Glukose- und Lipidmetabolismus und verhindert den Ausbruch des Diabetes; eine eindeutige Wechselbeziehung von funktioneller Insulinsensitivität

und IMCL scheint auf den ersten Blick jedoch nicht gegeben. Lediglich bei den schlanken Kontrollen entspricht der niedrige IMCL-Gehalt der vergleichsweise hohen Insulinempfindlichkeit im Glukose-Clamp-Versuch. Die behandelten obesen Tiere hingegen zeigen am Ende der Studie zwar funktionell eine verbesserte Insulinsensitivität im Vergleich zu den unbehandelten obesen Ratten, ihr IMCL-Gehalt liegt jedoch nicht entsprechend niedriger.

Warum liegen die IMCL-Spiegel der obesen unbehandelten und behandelten ZDF Ratten am Ende der Langzeitstudie in etwa auf einem Niveau? Und warum nimmt das IMCL absolut gesehen bei den obesen Kontrollen und auch bei den schlanken Kontrollen im Verlauf der Studie deutlich ab, wenngleich die Tiere im Glukose Clamp eher insulinresistenter werden?

Diese Phänomene müssen zunächst im Kontext mit der bereits erwähnten katabolen Stoffwechselsituation der 22 bis 24 Wochen alten obesen diabetischen Ratten gesehen werden. Die Tiere sind krank; ihr Organismus ist nicht mehr in der Lage, die gravierenden Stoffwechselerkrankungen zu kompensieren. Sie mobilisieren alle noch verfügbaren Energie- und Substratspeicher; somit könnte die Abnahme des per se drastisch erhöhten IMCL erklärt werden. Im Unterschied zum insulinresistenten, nicht-diabetischen Modell befinden sie sich in einer katabolen Stoffwechsellage. Diese ist gekennzeichnet durch vergleichsweise niedrige Insulinspiegel (Erschöpfung der  $\beta$ -Zellen des Pankreas) sowie Störungen der Glukose- und Lipid-Homöostase und der Nierenfunktion, die nicht mehr kompensiert werden können. Daher sinkt das IMCL bei diesen Tieren im Studienverlauf mit der Manifestation des Diabetes deutlich ab.

Des Weiteren sind die obesen unbehandelten ZDF Ratten im Glukose-Clamp insulinresistenter als die behandelten Tiere; und das trotz vergleichsweise ähnlicher IMCL-Spiegel. Hier kommt ein weiteres Phänomen zum Tragen: die Tiere sind zu diesem Zeitpunkt bereits diabetisch; ihre Insulinresistenz im Glukose-Clamp ist daher nicht mehr eine alleinig primäre, womöglich in ursächlichem Zusammenhang mit dem IMCL stehende. Sie zeigen vielmehr eine sekundäre, Hyperglykämie-induzierte Insulinresistenz im Rahmen des manifesten Diabetes. Die entgleiste Stoffwechselsituation der Tiere mit Hyperglykämie, Hypoinsulinämie, Körpergewichtsverlust und Mobilisierung der Energiereserven muss somit bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden.

Im Alter von 16 Wochen hingegen weisen die behandelten ZDF Ratten ein deutlich reduziertes IMCL im Vergleich zu den obesen Kontrollen auf. Zu diesem Zeitpunkt befinden sich die obesen Tiere noch auf der Schwelle zum Diabetes im Stadium der Kompensation. Daher sind die Ergebnisse aussagekräftiger im Hinblick auf einen Zusammenhang zwischen IMCL und Insulinresistenz. Im Alter von 22 Wochen aber hat das IMCL der obesen Kontrollen plötzlich stark abgenommen, da Energiespeicher jeder Form mobilisiert werden. Der IMCL-Gehalt der behandelten Tiere sinkt nicht weiter ab, was auf einen maximalen, nicht steigerungsfähigen Effekt der Behandlung auf das IMCL bereits im Alter von 16 Wochen (oder früher) hindeutet. Somit liegen plötzlich der aufgrund pharmakologischer Intervention verringerte IMCL-Gehalt der behandelten Ratten und der aufgrund der katabolen Stoffwechselsituation verringerte IMCL-Gehalt der unbehandelten Ratten etwa auf gleicher Höhe. Schlussfolgernd kann im Hinblick auf zukünftige Studien gesagt werden, dass die

männliche ZDF Ratte als Modell für Insulinresistenz vor der Manifestation des Diabetes mit seinen komplexen katabolen Begleiterscheinungen untersucht werden sollte.

Die Abnahme der IMCL-Spiegel bei den schlanken Tieren über den Zeitverlauf ist womöglich ein altersabhängiges Phänomen: mit steigendem Lebensalter nimmt das IMCL physiologischerweise ab (Neumann-Haefelin et al., 2002).

Die Behandlung der ZDF Ratten erfolgte mit dem bereits diskutierten Rosiglitazon (s.o.) sowie mit dem PPAR $\alpha$ -Agonisten PAA.

Über die „Insulin-Sensitizing“-Wirkung von PPAR $\alpha$ -Agonisten wurden bereits Arbeiten veröffentlicht. In einer Studie an mit einer Fett-Diät gefütterten Ratten wurde gezeigt, dass nach zweiwöchiger Behandlung mit einem PPAR $\alpha$ -Agonisten die Insulinsensitivität der Tiere deutlich verbessert und gleichzeitig der Lipidgehalt der Skelettmuskulatur reduziert war (Ye et al., 2001).

Auch im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Verbesserung der Insulinsensitivität nach Behandlung mit dem PPAR $\alpha$ -Agonisten PAA demonstriert werden. Eine deutliche Reduktion des IMCL-Gehalts war zu beobachten, wobei auf den ersten Blick die gleichzeitige Abnahme des IMCL bei den obesen Kontrollen widersprüchlich erscheint. Hier muss wiederum der oben bereits diskutierte Diabetes der Tiere berücksichtigt werden. Richtet man das Augenmerk auf die IMCL-Spiegel im Alter von 16 Wochen, so wird die Reduktion des IMCL infolge der pharmakologischen Intervention deutlich. Zu diesem Zeitpunkt ist die Aussagekraft der Messung im Hinblick auf eine IMCL-Reduktion in Verbindung mit einer Insulinsensitivitätssteigerung größer, da noch kein Diabetes-induzierter IMCL-Schwund gegeben ist. Aufgrund des unterschiedlichen Wirkmechanismus blieb bei der

Behandlung mit dem PPAR $\alpha$ -Agonisten (PAA) die nach Rosiglitazon-Gabe beobachtete extreme Körpergewichtszunahme aus. Die obesen, mit PAA behandelten ZDF Ratten zeigten zwar einen linearen Anstieg des Körpergewichts, dieser schien aber einer physiologischen Wachstumskurve zu entsprechen. Die Körpergewichtszunahme verlief in etwa parallel zu den schlanken Kontrolltieren.

PPAR $\alpha$ -Agonisten wirken über eine Induktion der Expression bestimmter Gene, welche in einer gesteigerten hepatischen Fettsäure-Oxidation und in einer verminderten Synthese und Freisetzung von Triglyzeriden resultiert (Staels et al., 1998; Minnich et al., 2001). Man vermutet, dass die PPAR $\alpha$ -vermittelte gesteigerte Lipidoxidation in der Leber und die in vivo beobachtete Verbesserung der Insulinsensitivität nach PPAR $\alpha$ -Behandlung kausal zusammenhängen (Ye et al., 2001). Als Bindeglied wird auch hier die Reduzierung des Lipid-Angebotes diskutiert.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sowohl PPAR $\gamma$ - als auch PPAR $\alpha$ -Agonisten nach chronischer Gabe die periphere Insulinsensitivität verbessern, allerdings durch gänzlich verschiedene Mechanismen: PPAR $\gamma$ -Agonisten verschieben Lipide ins Fettgewebe, PPAR $\alpha$ -Agonisten fördern die Lipid-Verstoffwechslung in der Leber (siehe Anhang, *Abb.VIII-2 & VIII-3*). Beide scheinen dabei eine Reduktion des mit der Insulinsensitivität eng zusammenhängenden IMCL zu bewirken. Die akute Gabe eines Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptor-Agonisten führt ebenfalls zu einer Verbesserung der Insulinsensitivität, allerdings über den Mechanismus der akuten und kurzfristigen Hemmung der adipozytären Lipolyse und somit zunächst ohne Auswirkung auf das IMCL.

### IV.5 Ausblick

Die vorliegende Arbeit zeigt einen engen Zusammenhang zwischen IMCL und Insulinresistenz am Tiermodell auf. Bei insulinresistenten Ratten korrelieren der IMCL-Gehalt und der Grad der Insulinsensitivität.

Sowohl die ZF als auch die ZDF Ratten sind als Tiermodelle für Insulinresistenz geeignet; allerdings erweist sich die Verwendung obeser männlicher ZDF Ratten als Kontrollgruppe im Rahmen pharmakologischer Studien insofern als problematisch, als dass der Ausbruch des Diabetes im Alter von 12 bis 16 Wochen einen Vergleich mit behandelten und daher nicht-diabetischen Tieren beeinträchtigt. Die Verwendung obeser weiblicher ZDF Ratten könnte hier Abhilfe schaffen, optional wäre durch Gabe einer Fett-Diät jederzeit das Auslösen des Typ II Diabetes möglich. Auch eine Abwandlung der Studiendauer käme infrage: ein frühzeitiges Beenden des Versuchs vor der Manifestation des Diabetes würde sich anbieten.

Das Modell der Fruktose-induzierten Insulinresistenz an der Wistar Ratte eignet sich als Tiermodell für erworbene Insulinresistenz; interessant könnte auch die Induktion einer Insulinresistenz durch Fütterung einer Fett-Diät sein.

Mit dem Nachweis des engen Zusammenhangs zwischen IMCL und Insulinresistenz eröffnen sich neue Ansätze und Perspektiven für die Verbesserung der Insulinresistenz, die als zentrales pathophysiologisches Prinzip des Typ II Diabetes von großer Bedeutung für die Diabetes-Prävention und -Therapie ist. Neben den konventionellen Strategien, wie der Erhöhung des Insulinangebots durch exogenes Insulin, der Steigerung der endogenen Insulinsekretion (Sulfonylharnstoffe), der Verminderung endogener Glukoseproduktion (Metformin)

und der Hemmung der postprandialen Glukoseabsorption ( $\alpha$ -Glukosidase-Inhibitoren), rückt die Möglichkeit der Verbesserung der Insulinresistenz per se mehr und mehr in den Mittelpunkt des Interesses.

Die PPAR-Agonisten (sowohl  $\gamma$  als auch  $\alpha$ ) mit dem postulierten gemeinsamen Effekt der Reduktion einer Lipidakkumulation im Muskel könnten an Bedeutung für die Therapie insulinresistenter Zustände noch gewinnen. Erreicht man eine Absenkung des IMCL-Gehaltes, so verbessert man offensichtlich die periphere Insulinsensitivität.

Es darf jedoch nicht vergessen werden, dass das IMCL nur eine, wenn auch bedeutsame, Facette des komplexen Phänomens der Insulinresistenz darstellt; ohne Zweifel können weitere Faktoren wie Dyslipidämie, eine gestörte hepatische Glukoneogenese oder auch genetische Defekte an der Entstehung der Insulinresistenz beteiligt sein (Salway, 1999; Kahn & Flier, 2000; Saltiel, 2001). Daher macht auch der therapeutische Einsatz sogenannter „antilipolytischer“ Substanzen wie des selektiven fettzellspezifischen Adenosin-A<sub>1</sub>-Agonisten Sinn: über eine akute Absenkung der freien Fettsäuren kann die Glukose-Verstoffwechslung verbessert werden.

In diesem Kontext stellen sich weitere grundlegende Fragen: Wie hängen IMCL und Insulinresistenz zusammen? Sind sie voneinander abhängig, bedingen sie einander? Welcher Defekt ist der primär zugrundeliegende?

Diese Arbeit kann darauf keine abschließende Antwort geben; dafür ist die Problematik zu komplex. Allerdings weisen die vorliegenden Ergebnisse klar auf das Vorhandensein einer Wechselbeziehung zwi-

schen Insulinresistenz und IMCL hin und stimmen mit dem aktuell diskutierten Modell der Insulinresistenz-Entstehung überein.

Zur Zeit wird die Akkumulation von Lipiden in der Skelettmuskelzelle als ein Surrogat für nachfolgende biochemische Prozesse diskutiert, welche die Insulinsensitivität der Muskelzelle herabsetzen (McGarry & Dobbins, 1999; Ellis et al., 2000; Dobbins et al., 2001). Man vermutet, dass nicht die Muskel-Lipide selbst Verursacher der Insulinresistenz sind, sondern dass eine andere, sich von ihnen ableitende Struktur die Insulinwirkung am Muskel beeinträchtigen könnte (Chalkley et al., 1998). Im Mittelpunkt des Interesses stehen dabei Fettsäuremetaboliten wie LCACoA (Shulman, 2000), die über eine Inhibierung von Schlüsselenzymen des Glukosestoffwechsels (z.B. der Hexokinase) sowie über eine PKC-vermittelte verminderte GLUT4-Translokation die Glukose-Verstoffwechslung in der Muskelzelle herabsetzen könnten (siehe Anhang, *Abb.VIII-1*).

Somit wäre die intrazelluläre Akkumulation von Triglyzeriden und folglich auch von intrazellulären Fettsäuremetaboliten in auf Insulin ansprechenden Geweben das primäre Ereignis und würde sekundär eine verminderte Insulinwirkung nach sich ziehen.

Das IMCL als Indikator peripherer Insulinresistenz bietet neben neuen Therapieansätzen auch Möglichkeiten für die Diagnostik und für die Grundlagenforschung.

Bereits Jahre bis Jahrzehnte vor der Manifestation des Diabetes mit Hyperglykämie und Hypoinsulinämie sind bei Betroffenen erste Anzeichen einer Insulinresistenz feststellbar (Lillioja et al., 1988; Warram et al., 1990) wie z.B. verminderte Glukosetoleranz, herabgesetzte Insulinempfindlichkeit im Glukose-Clamp-Versuch und auch erhöhtes IMCL (Jacob et al., 1999). Das mittels MRS nachweisbare und



quantifizierbare IMCL würde sich ideal als Marker zur „Früherkennung“ insulinresistenter Zustände eignen. Nicht-invasiv könnten so Rückschlüsse auf die jeweilige Insulinsensitivität und auf eine mögliche Disposition für den Typ II Diabetes gezogen werden.

Auch die longitudinale Charakterisierung neuer, in der Entwicklung befindlicher Therapeutika, welche den Lipidmetabolismus des Muskels und somit die Insulinsensitivität beeinflussen, wäre mittels Magnetresonanztomographie möglich.

### **V Zusammenfassung**

Die vorliegende Arbeit untersucht das Phänomen der Insulinresistenz sowie Möglichkeiten der pharmakologischen Intervention am Tiermodell der Ratte.

Insulinresistenz ist ein pathophysiologischer Zustand, bei dem die Insulinwirkung abgeschwächt, verändert oder beeinträchtigt ist; eine physiologische Insulinkonzentration ist nicht mehr in der Lage, die biologischen Prozesse angemessen zu steuern. Insulinresistenz ist ein regelmäßiges Charakteristikum des Prädiabetes bis hin zum manifesten Typ II Diabetes; die periphere Insulinsensitivität wird dominant von der muskulären Glukose-Utilisation bestimmt.

Es gibt zunehmend Hinweise für eine Beteiligung von Lipiden an der Insulinresistenz. Insbesondere die Speicherung und Akkumulation von Lipiden in der Skelettmuskelzelle (intramyozelluläre Lipide; IMCL) wird aktuell als ein Surrogat für nachfolgende biochemische Prozesse diskutiert, welche die Insulinsensitivität der Muskelzelle herabsetzen.

Zur Quantifizierung der Insulinsensitivität als Maß der muskulären Glukose-Utilisation wurde im Rahmen dieser Dissertation die euglykämisch-hyperinsulinämische Clamp-Technik angewandt. Zum Nachweis des intramyozellulären Lipids wurde die Magnetresonanzspektroskopie als Meßmethode an der Ratte etabliert. Diese Methode ermöglicht die nicht-invasive, beliebig oft wiederholbare Messung intramyozellulären Lipids in vivo.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte am Tiermodell der Ratte ein Zusammenhang zwischen intramyozellulärem Lipid und Insulinresistenz gezeigt werden.

Bei insulin sensitiven Wistar Ratten konnte durch Fütterung einer Fruktose-Diät eine funktionelle Insulinresistenz induziert und gleichzeitig erhöhtes intramyozelluläres Lipid festgestellt werden.

Die Behandlung insulinresistenter Ratten mit einem PPAR $\gamma$ -Agonisten bzw. mit einem PPAR $\alpha$ -Agonisten, welche relativ neue Gruppen von Antidiabetika darstellen, erhöhte die Insulinsensitivität der Tiere und führte gleichzeitig zu einer deutlichen Abnahme der intramyozellulären Lipide. Beide Substanzklassen scheinen in engem Zusammenhang mit dem Lipidmetabolismus der Muskelzelle zu stehen und eine Reduktion des mit der Insulinsensitivität eng zusammenhängenden intramyozellulären Lipids zu bewirken, allerdings durch unterschiedliche Mechanismen.

Diese Möglichkeit der Verbesserung peripherer Insulinresistenz durch eine pharmakologische Absenkung des IMCL eröffnet neue Perspektiven für die Behandlung insulinresistenter Zustände und somit für die Prävention des Typ II Diabetes.

Des weiteren bietet sich das IMCL ideal als Marker zur „Früherkennung“ insulinresistenter Zustände an. Nicht-invasiv können so Rückschlüsse auf die individuelle Insulinsensitivität und auf eine mögliche Disposition für den Typ II Diabetes gezogen werden. Auch die longitudinale Charakterisierung neuer, in der Entwicklung befindlicher Therapeutika, welche den Lipidmetabolismus des Muskels und somit die Insulinsensitivität beeinflussen, mittels Magnetresonanztomographie wäre denkbar.

### Summary

This study investigates the phenomenon of insulin resistance as well as opportunities for a pharmacologic intervention in the rat.

Insulin resistance is a pathophysiological condition, characterized by a diminished, impaired or different in vivo biological response to the hormone; normal circulating insulin concentrations are insufficient to regulate biological processes properly. Insulin resistance is a common feature in the prediabetic state as well as in overt type II diabetes; peripheral insulin sensitivity depends predominantly on the glucose utilisation of muscle tissue.

There is growing evidence that increased levels of lipids are involved in insulin resistance. In particular, the storage and accumulation of lipids in muscle cells (intramyocellular lipid; IMCL) is proposed to serve as a surrogate marker for following biochemical processes which impair muscle insulin sensitivity.

Insulin sensitivity as an indicator for the glucose utilisation of muscle tissue was measured by the euglycemic-hyperinsulinemic clamp technique. Magnetic resonance spectroscopy was used for the assessment of intramyocellular lipids. This non-invasive repeatable method was hereby established in the rat.

These studies demonstrate a distinct relation between IMCL and insulin resistance in the rat.

In insulin sensitive Wistar rats, functional insulin resistance was induced by feeding a high-fructose diet. The intramyocellular lipid pool increased simultaneously.

The treatment of insulin resistant rats with a PPAR $\gamma$ - or a PPAR $\alpha$ -agonist respectively, representing rather new classes of antidiabetic

agents, resulted in an improvement of insulin sensitivity and a reduction of intramyocellular lipids. Both agents appear to affect the lipid metabolism of the muscle cell by distinct mechanisms which ultimately reduce lipid accumulation in muscle and thus influence insulin sensitivity.

The prospect of enhancing insulin sensitivity by reducing muscle lipid accumulation offers new perspectives for the treatment of insulin resistant states as well as for the prevention of type II diabetes.

Furthermore, IMCL presents a marker for the early diagnosis of insulin resistant states. Conclusions on the individual insulin sensitivity and on a potential disposition for type II diabetes could be drawn non-invasively. Additionally, magnetic resonance spectroscopy might provide a useful method for the longitudinal characterization of new drugs affecting muscle lipid metabolism and thereby influencing insulin sensitivity.

## VI Literaturverzeichnis

- Abbott WG, Foley JE (1987).** *Comparison of body composition, adipocyte size and glucose and insulin concentration in Pima Indian and Caucasian children.* Metabolism 36: 576-579.
- Apweiler A, Freund P (1993).** *Development of glucose intolerance in obese (fa/fa) Zucker rats.* Horm. Metab. Res. 25: 521-524.
- Armstrong RB, Phelps RO (1984).** *Muscle fiber type composition of the rat hindlimb.* Am. J. Anat. 171: 259-272.
- Asllani I, Shankland E, Pratum T, Kushmerick M (1999).** *Anisotropic orientation of lactate in skeletal muscle observed by dipolar coupling in  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy.* J. Magn. Res. 139: 213-224.
- Auwerx J, Schoonjans K, Fruchart JC, Staels B (1996).** *Regulation of triglyceride metabolism by PPARs : fibrates and thiazolidinediones have distinct effects.* J. Atheroscler. Thromb. 3: 81-89.
- Barman Balfour JA, Plosker GL (1999).** *Rosiglitazone: new drug profile.* Drugs 57: 921-930.
- Bligh EG, Deyer WJ (1959).** *A rapid method of total lipid extraction and purification.* J. Biochem. Physiol. 37: 911.
- Boden G (1997).** *Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM.* Diabetes 46: 3-10.
- Boden G, Lebed B, Schatz M, Homko C, Lemieux S (2001).** *Effects of acute changes of plasma free fatty acids on intramyocellular fat content and insulin resistance in healthy subjects.* Diabetes 50: 1612-1617.
- Boesch C (1997).** *Magnetresonanz-Spektroskopie in vivo.* Labor und Medizin 24: 245-253.
- Boesch C, Slotboom J, Hoppeler H, Kreis R (1997).** *In vivo determination of intramyocellular lipids in human muscle by means of localized  $^1\text{H}$ -spectroscopy.* Magn Reson Med 37: 484-493.
- Bottomley PA, Lee Y, Weiss RG (1997).** *Total creatine in muscle: Imaging and quantification with proton MR spectroscopy.* Radiology 204: 403-410.

- Bowen L, Stein PP, Stevenson R, Shulman GI (1991).** *The effect of CP68,722, a thiazolidinedione derivative, on insulin sensitivity in lean and obese Zucker rats.* Metabolism 40: 1025-1030.
- Brechtel K, Machann J, Jacob S, Strempler A, Schick F, Häring HU, Claussen CD (1999).** *In vivo <sup>1</sup>H-MR-Spektroskopie: Bestimmung des intra- und extramyozellulären Lipidgehalts in Abhängigkeit von der Insulinwirkung bei direkten Nachkommen von Typ 2 Diabetikern.* Fortschr. Röntgenstr. 171: 113-120.
- Bronwyn AE, Poynten A, Lowy AJ, Furler SM, Chisholm DJ, Kraegen EW, Cooney GJ (2000).** *Long-chain acyl-CoA esters as indicators of lipid metabolism and insulin sensitivity in rat and human muscle.* Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 279: E554-E560.
- Bruker Medical Report (1983 u. 1985).** *Einführung in die MR-Tomographie und in die in vivo Spektroskopie. Grundlagen.* 1-16.
- Chalkley SM, Hettiarachchi M, Chisholm DJ, Kraegen EW (1998).** *Five-hour fatty acid elevation increases muscle lipids and impairs glycogen synthesis in the rat.* Metabolism 47: 1121-1126.
- Chen CC, Wang HJ, Shih HC, Sheen LY, Chang CT, Chen RH, Wang TY (2001).** *Comparison of the metabolic effects of metformin and troglitazone on fructose-induced insulin resistance in male sprague-dawley rats.* J. Formos Med. Assoc. 100: 176-180.
- Chen KS, Heydrick S, Kurowski T, Ruderman NB (1991).** *Diacylglycerol-protein kinase C signalling in skeletal muscle: a possible link to insulin resistance.* Trans. Assoc. Am. Phys. 104: 206-212.
- Chen MT, Kaufman LN, Spennetta T, Shrago E (1992).** *Effects of high fat-feeding to rats on the interrelationship of body weight, plasma insulin, and fatty acyl-coenzyme A esters in liver and skeletal muscle.* Metabolism 41: 564-569.
- Colditz GA et al. (1990).** *Weight as a risk factor for clinical diabetes in women.* Am. J. Epidemiol. 132: 501-513.
- Corkey FE, Deeney JT, Yaney GC Tornheim K, Prentki M (2000).** *The role of long-chain fatty acyl-CoA esters in  $\beta$ -cell signal transduction.* J. Nutr. 130: 299S–304S.
- Corsetti JP, Sparks JD, Peterson RG, Smith RL, Sparks CE (2000).** *Effect of dietary fat on the development of non-insulin dependent diabetes mellitus in obese Zucker diabetic fatty male and female rats.* Atherosclerosis 148: 231–241.

- DeFronzo R, Tobin J, Andres R (1979).** *Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance.* Am. J. Physiol. 237(3): E214-E223.
- DeSouza CJ, Eckhardt M, Gagen K, Dong M, Chen W, Laurent D, Burkey BF (2001).** *Effects of pioglitazone on adipose tissue remodeling within the setting of obesity and insulin resistance.* Diabetes 50: 1863-1871.
- Dobbins RL, Szczepaniak LS, Bentley B, Esser V, Myhill J, McGarry JD (2001).** *Prolonged inhibition of muscle carnitine palmitoyltransferase-1 promotes intramyocellular lipid accumulation and insulin resistance.* Diabetes 50: 123-130.
- Dresner A, Laurent D, Marcucci M, Griffin ME, Dufour S, Cline GW, Slezak LA, Andersen DK, Hundal RS, Rothman DL, Petersen KF, Shulman GI (1999).** *Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity.* J. Clin. Invest. 103: 253-259.
- Ellis BA, Poynten A, Lowy AJ, Furler SM, Chisholm DJ, Kraegen EW, Cooney GJ (2000).** *Long-chain acyl-CoA esters as indicators of lipid metabolism and insulin sensitivity in rat and human muscle.* Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 279: E554-E560.
- Etgen GJ, Oldham BA (2000).** *Profiling of Zucker Diabetic Fatty Rats in their progression to the overt diabetic state.* Metabolism 49: 684-688.
- Ferrannini E, Barrett EJ, Bevilacqua S, DeFronzo RA (1983).** *Effect of fatty acids on glucose production and utilization in man.* J. Clin. Invest. 72: 1737-1747.
- Ferrannini E, Natali A, Bell P, Cavallo-Perin P, Lalic N, Mingrone B (1997).** *Insulin resistance and hypersecretion in obesity.* J. Clin. Invest. 100: 1166-1173.
- Flatt PR, Lenzen S et al. (1994).** *Insulin secretion and pancreatic  $\beta$ -cell research.* Smith Gordon, London: pp.331-336.
- Foley JE (1994).** *Rationale for activation of A1 adenosine receptors in adipocytes in the treatment of non-insulin dependent diabetes mellitus.* Drug Dev. Res. 32: 126.



- Forouhi NG, Jenkinson G, Thomas EL, Mullick S, Mierisova S, Bhonsle U, McKeigue PM, Bell JD (1999).** *Relation of triglyceride stores in skeletal muscle cells to central obesity and insulin sensitivity in European and South Asian men.* Diabetologia 42: 932-935.
- Francesconi M (1999).** *Diabetes Mellitus: Neue Aspekte in der Verwendung unterschiedlicher Sulfonylharnstoffe.* Forum Dr. Med, Medizinische Fachzeitschriften GmbH, Wien 03/99.
- Franke C (1998).** *NMR-Untersuchungen zur Thrombolyse beim experimentellen Schlaganfall – Entwicklung und Validierung der spektroskopischen Bildgebung.* Dissertation an der Universität Köln.
- Frayn KN (1993).** *Insulin resistance and lipid metabolism.* Curr. Opin. Lipid. 4: 197-204.
- Frayn KN, Coppack SW (1992).** *Insulin resistance, adipose tissue and coronary heart disease.* Clin. Sci. 82: 1-8.
- Fujita T, Sugiyama Y, Taketomi S et al. (1983).** *Reduction of insulin resistance in obese and/or diabetic animals by ciglitazone, a new antidiabetic agent.* Diabetes 32: 804-810.
- Funk C, Ponelle C, Scheuermann G, Pantze M (2001).** *Cholestatic potential of troglitazone as a possible factor contributing to troglitazone-induced hepatotoxicity: in vivo and in vitro interaction at the canalicular bile salt export pump (bsep) in the rat.* Mol. Pharmacol. 59: 627-635.
- Gavrilova O et al. (2000).** *Surgical implantation of adipose tissue reverses diabetes in lipoatrophic mice.* J. Clin. Invest. 105: 271-278.
- Green A (1987).** *Adenosine receptor down-regulation and insulin resistance following prolonged incubation of adipocytes with an A1 adenosine receptor agonist.* J. Biol. Chem. 262: 15702-15707.
- Griffin ME, Marcucci MJ, Cline GW, Bell K, Barucci N, Lee D, Goodyear LJ, Kraegen EW, White MF, Shulman GI (1999).** *Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C and alterations in the insulin signaling cascade.* Diabetes 48: 1270-1274.
- Guay DRP (1999).** *Micronized fenofibrate: a new fibric acid hypolipidemic agent.* Ann. Pharmacother. 1999: 1083-1103.
- Guerre-Millo M, Gervois P, Raspé E, Madsen L, Poulain P, Derudas BB, Herbert JM, Winegar DA, Willson TM, Fruchart JC, Berge RK, Staels B (2000).** *PPAR alpha activators improve insulin sensitivity and reduce adiposity.* J. Biol. Chem. (March): 1-22.

- Gurden MF, Coates J, Ellis F, Evans B, Foster M, Hornby E, Kennedy I, Martin DP, Strong P, Vardey CJ, Wheeldon A (1993).** *Functional characterisation of three adenosine receptors.* Br. J. Pharmacol. 109: 693-698.
- Hamman RF (1992).** *Genetic and environmental determinants of NIDDM.* Diabetes Metab. Rev. 8: 287-338.
- Hansen BC, Saye J, Wennogle LP (1999).** *The Metabolic Syndrome X – convergence of insulin resistance, glucose intolerance, hypertension, obesity, and dyslipidemia.* Ann. NY Acad. Sc. 892.
- Haubenwallner S, Essenburg AD, Barnett BC, Pape ME, DeMattos RB, Krause BR, Minton LL, Auerbach BJ, Newton RS, Leff T, Bisgaier CL (1995).** *Hypolipidemic activity of select fibrates correlates to changes in hepatic apolipoprotein C-III expression: a potential physiologic basis for their mode of action.* J. Lipid Res. 36: 2541-2551.
- Hazle JD, Narayana PA, Dunsford HA (1990).** *Chronic carbon tetrachloride and phospholipase D hepatotoxicity in rats: in vivo <sup>1</sup>H magnetic resonance, total lipid analysis, and histology.* Magn. Reson. Med. 15: 211-228.
- He J, Watkins S, Kelley DE (2001).** *Skeletal muscle lipid content and oxidative enzyme activity in relation to muscle fiber type in type 2 diabetes and obesity.* Diabetes 50: 817-823.
- Hebel R, Stromberg MW (1986).** *Anatomy and embryology of the laboratory rat.* Biomed Verlag.
- Hoffman BB, Dall'Aglio E, Hollenbeck C, Chang H, Reaven GM (1986).** *Suppression of free fatty acids and triglycerides in normal and hypertriglyceridaemic rats by the adenosine receptor agonist phenylisopropyladenosine.* J. Pharmacol. Exp. Ther. 239: 715-718.
- Hornych A, Marre M, Mimran A, Chaignon M, Asmar R, Fauvel JP (2000).** *Microalbuminuria in arterial hypertension. Measurement, variables, interpretation, recommendations.* Arch. Mal Coeur Vaiss. 93: 1304-1308.
- Ide T, Nakazawa T, Mochizuki T, Murakami K (2000).** *Tissue-specific actions of antidiabetic thiazolidinediones on the reduced fatty acid oxidation in skeletal muscle and liver of ZDF rats.* Metabolism 49: 521-525.
- Inzucchi SE et al. (1998).** *Efficacy and metabolic effects of metformin and troglitazone in type II diabetes mellitus.* N. Engl. J. Med. 338: 867-872.
- Isooma B, Henricsson M, Almgren P, Tuomi T, Taskinen MR, Groop L (2001).** *The metabolic syndrome influences the risk of chronic complications in patients with type II diabetes.* Diabetologia 44: 1148-1154.

- Jacob S, Machann J, Rett K, Brechtel K, Volk A, Renn W, Maerker E, Matthaei S, Schick F, Claussen CD, Häring HU (1999).** *Association of increased intramyocellular lipid content with insulin resistance in lean nondiabetic offspring of type 2 diabetic subjects.* Diabetes 48: 1113-1119.
- Jacobson KA, Trivedi BK, Churchill PC, Williams M (1991).** *Novel therapeutics acting via purine receptors.* Biochem. Pharmacol. 41: 1399-1410.
- Kahn BB, Flier JS (2000).** *Obesity and insulin resistance.* J. Clin. Inv. 106: 473-481.
- Kahn CR (1978).** *Insulin resistance, insulin insensitivity, and insulin unresponsiveness: a necessary distinction.* Metabolism 27: 1893-1902.
- Kahn CR, Chen L, Cohen SE (2000).** *Unraveling the mechanism of action of thiazolidinediones.* J. Clin. Inv. 106: 1305-1307.
- Karasik A, Hattori M (1985).** *Use of animal models in the study of diabetes.* In: Joslin's Diabetes (Joslin EP et al.): 317-350.
- Kellerer M, Kroder G, Tippmer S et al. (1994).** *Troglitazone prevents glucose-induced insulin resistance of insulin receptor in rat-1 fibroblasts.* Diabetes 43: 447-453.
- Kelley DE, Mokan M, Simoneau JA, Mandarino LJ (1993).** *Interaction between glucose and free fatty acid metabolism in human skeletal muscle.* J. Clin. Invest. 92: 91-98.
- Kelley DE, Mandarino LJ (2000).** *Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance. A reexamination.* Diabetes 49: 677-683.
- Keppler D, Decker K (1974).** *Metabolite: Substanzen im Kohlenhydratstoffwechsel.* In: Methoden der Enzymanalyse. (Bergmeier): 1171-1176.
- Kersten S, Desvergne B, Wahli W (2000).** *Roles of PPARs in health and disease.* Nature 405: 421-424.
- Kim J, Gavrilova O, Chen Y, Reitman M, Shulman GI (2000).** *Mechanisms of insulin resistance in A-ZIP/F-1 fatless mice.* J. Biol. Chem. 275: 8456-8460.
- Kirsch DM, Bachmann W, Häring HU (1984).** *Ciglitazone reverses c-AMP-induced post-insulin receptor resistance in rat adipocytes in vitro.* FEBS Lett. 176: 49-54.

- Koyama K, Chen G, Lee Y, Unger RH (1997).** *Tissue triglycerides, insulin resistance, and insulin production: implications for hyperinsulinemia of obesity.* Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 273: E708-E713.
- Kraegen EW, James DE, Storlien LH (1986).** *In vivo insulin resistance in individual peripheral tissues of the high fat fed rat: assessment by euglycaemic clamp plus deoxyglucose administration.* Diabetologia 29: 192-198.
- Kraegen EW, Clark PW, Jenkins AB, Daley EA, Chisholm DJ, Storlien LH (1991).** *Development of muscle insulin resistance after liver insulin resistance in high-fat-fed rats.* Diabetes 40: 1397-1403.
- Kreis R, Boesch C (1996).** *Spatially localized, one- and two-dimensional NMR spectroscopy and in vivo application to human muscle.* J Magn Reson 13: 103-118.
- Krssak M, Falk Petersen K, Dresner A, DiPietro L, Vogel SM, Rothman DL, Shulman GI, Roden M (1999).** *Intramyocellular lipid concentrations are correlated with insulin sensitivity in humans: a  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy study.* Diabetologia 42: 113-116.
- Laybutt DR, Schmitz-Pfeiffer C, Saha AK, Ruderman NB, Biden TJ, Kraegen EW (1999).** *Muscle lipid accumulation and protein kinase C activation in the insulin-resistant chronically glucose-infused rat.* Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 277: E1070-E1076.
- Lee MK, Olefsky JM (1995).** *Acute effects of troglitazone on in vivo insulin action in normal rats.* Metabolism 44: 1166-1169.
- Lee Y, Hirose H, Ohneda M, Johnson JH, McGarry JD, Unger RH (1994).**  *$\beta$ -cell lipotoxicity in the pathogenesis of NIDDM of obese rats: impairment in adipocyte- $\beta$ -cell relationships.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 10878-10882.
- Lehmann JM, Moore LB, Smith Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA (1995).** *An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma).* J. Biol. Chem. 270: 12953-12956.
- Lemberger T, Desvergne B, Wahli W (1996).** *Peroxisome proliferator-activated receptors: a nuclear receptor signaling pathway in lipid physiology.* Ann. Rev. Cell. Dev. Biol. 12: 335-363.
- Levin K, Schroeder HD, Alford FP, Beck-Nielsen H (2001).** *Morphometric documentation of abnormal intramyocellular fat storage and reduced glycogen in obese patients with type 2 diabetes.* Diabetologia 44: 824-833.

- Lillioja S, Bogardus C, Mott DM, Kennedy AL, Knowler WC, Howard BV (1985).** *Relationship between insulin-mediated glucose disposal and lipid metabolism in man.* J. Clin. Invest. 75: 1106-1115.
- Lillioja S et al. (1988).** *Impaired glucose tolerance as a disorder of insulin action. Longitudinal and cross-sectional studies in Pima Indians.* N. Engl. J. Med. 318: 1217-1225.
- Löffler G, Petrides PE (1997).** *Endokrine Gewebe: Insulin.* In: Biochemie und Pathobiochemie, Springer-Verlag, 5. Auflage: 787-811.
- Longo R, Ricci C, Masutti F, Vidimari R, Croce LS, Bercich L, Tiribelli C, Dalla Palma L (1993).** *Fatty infiltration of the liver. Quantification by  $^1\text{H}$  localized magnetic resonance spectroscopy and comparison with computed tomography.* Invest. Radiol. 28: 297-302.
- Martin B, Warram J, Krolewski A, Bergman R, Soeldner J, Kahn C (1992).** *Role of glucose and insulin resistance in development of type II diabetes mellitus. Results of a 25-year follow-up study.* Lancet 340: 925-929.
- Matthaei S, Stumvoll M, Häring HU (2001).** *Thiazolidindione (Insulinsensitizer). Neue Aspekte in der Therapie des Diabetes mellitus Typ 2.* Deutsches Ärzteblatt 98, Heft 14: B774-B780.
- McGarry JD (1992).** *What if Minkowski had been ageusic? An alternative angle on diabetes.* Science 258: 766-770.
- McGarry JD, Dobbins RL (1999).** *Fatty acids, lipotoxicity and insulin secretion.* Diabetologia 42: 128-138.
- Minnich A, Tian N, Byan L, Bilder G (2001).** *A potent PPAR $\alpha$  agonist stimulates mitochondrial fatty acid  $\beta$ -oxidation in liver and muscle.* Am. J. Physiol. Endocrin. Metab. 280: E270-E279.
- Moesgaard B, Quistorff B, Christensen VG, Therkelsen I, Jorgensen PF (1995).** *Differences of post-mortem ATP turnover in skeletal muscle of normal and heterozygote malignant-hyperthermia pigs: comparison of P-NMR and analytical biochemical measurements.* Meat Sci. 39: 43-57.
- Mokdad AH, Serdula MK, Dietz WH, Bowman BA, Marks JS, Koplan JP (1999).** *The spread of the obesity epidemic in the United States, 1991-1998.* JAMA 282: 1519-1522.
- National Center for Health Statistics (1994).** *An epidemic of obesity.* News-week (1 Aug.1994) p.62.

- Neumann-Haefelin C, Kuhlmann J, Belz U, Kalisch J, Herling AW, Juretschke HP (2002).** *Determinants of intramyocellular lipid levels in rat hindleg muscle.* Abstract beim 10<sup>th</sup> annual scientific meeting der Intl. Soc. Magn. Reson. Med.
- Ntziachristos V, Kreis R, Boesch C, Quistorff B (1997).** *Dipolar resonance frequency shifts in <sup>1</sup>H MR spectra of skeletal muscle: confirmation in rats at 4.7T in vivo and observation of changes post mortem.* MRM 38: 33-39.
- Oakes ND, Cooney GJ, Camilleri S, Chisholm DJ, Kraegen EW (1997).** *Mechanisms of liver and muscle insulin resistance induced by chronic high-fat feeding.* Diabetes 46: 1768-1774.
- Oakes ND, Camilleri S, Furler SM, Chisholm DJ, Kraegen EW (1997).** *The insulin sensitizer, BRL 49653, reduces systemic fatty acid supply and utilization and tissue lipid availability in the rat.* Metabolism 46: 935-942.
- Okuno A, Tamemoto H, Tobe K, Ueki K, Mori Y, Iwamoto K, Umesono K, Akanuma Y, Fujiwara T, Horikoshi H, Yazaki Y, Kadowaki T(1998).** *Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats.* J. Clin. Invest. 101: 1354-1361.
- Olds RJ, Olds JR (1984).** *Farbatlas der Anatomie der Ratte. Sektionsanleitung.* Schober Verlags-GmbH.
- Olefsky JM (2000).** *Treatment of insulin resistance with peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  agonists.* J. Clin.Inv. 106: 467-472.
- Olsson RA, Pearson JD (1990).** *Cardiovascular purinoceptors.* Physiol. Rev. 70: 761-845.
- O`Rahilly S (1997).** *Science, medicine and the future. Non-insulin dependent diabetes mellitus: the gathering storm.* BMJ. 314: 955-959.
- Pagliassotti MJ, Gayles EC, Podolin DA, Wei Y., Morin CL (2000).** *Developmental stage modifies diet-induced peripheral insulin resistance in rats.* Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol. 278: R66-R73.
- Pan DA, Lillioja S, Kriketos AD, Milner MR, Baur LA, Bogardus C, Jenkins AB, Storlien LH (1997).** *Skeletal muscle triglyceride levels are inversely related to insulin action.* Diabetes 46: 983-988.
- Perseghin G, Scifo P, De Cobelli F, Pagliato E, Battezzati A, Arcelloni C, Vanzulli A, Testolin G, Pozza G, Del Maschio A, Luzi L (1999).** *Intramyocellular triglyceride content is a determinant of in vivo insulin resistance in humans.* Diabetes 48: 1600-1606.

- Pessin JE, Saltiel AR (2000).** *Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance.* J. Clin. Inv. 106: 165-169.
- Peters JM, Hennuyer N, Staels B, Fruchart JC, Fievet C, Gonzalez FJ, Auwerx J (1997).** *Alterations in lipoprotein metabolism in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-deficient mice.* J. Biol. Chem. 272 : 27307-27312.
- Peterson RG (1994).** *The Zucker diabetic fatty (ZDF) rat.* In: Lessons from animal diabetes. Smith-Gordon, London: 225-230.
- Phillips DIW, Caddy S, Ilic V, Fielding BA, Frayn KN, Borthwick AC, Taylor R (1996).** *Intramyocellular triglyceride and muscle insulin sensitivity: evidence for a relationship in nondiabetic subjects.* Metabolism 45: 947-950.
- Powell GL, Tippet PS, Kiorpes TC, McMillin J, Coll DE, Schulz H, Tanaka K, Kang ES, Shrago E (1985).** *Fatty acyl CoA as an effector molecule in metabolism.* Fed. Proc. 44: 81-84.
- Prentki M, Corkey BE (1996).** *Are the  $\beta$ -cell signaling molecules malonyl-CoA and cytosolic long-chain acyl-CoA implicated in multiple tissue defects of obesity and NIDDM?* Diabetes 45: 273-283.
- Qu X, Cooney G, Donnelly R (1997).** *Short-term metabolic and haemodynamic effects of GR79236 in normal and fructose-fed rats.* Eur. J. Pharmacol. 338: 269-276.
- Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA (1963).** *The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus.* The Lancet: 785-789.
- Randle PJ, Garland PB, Newsholme EA, Hales CN (1965).** *The glucose fatty acid cycle in obesity and maturity onset diabetes mellitus.* Ann. NY Acad. Sci. 131: 324-333.
- Reaven GM, Chang H, Ho H, Jeng CI, Hoffman BB (1988).** *Lowering of plasma glucose in diabetic rats by antilipolytic agents.* Am. J. Physiol. 254: E23-E30.
- Reaven GM, Hollenbeck C, Jeng CY, Wu MS, Chen YD (1988).** *Measurement of plasma glucose, free fatty acid, lactate, and insulin for 24h in patients with NIDDM.* Diabetes 37: 1020-1024.
- Reaven GM (1997).** *Pathophysiology of insulin resistance in human disease.* Physiol. Rev. 75: 473-486.

- Reiser S, Powell AS, Yang C-Y, Canary JJ (1997).** *An insulinogenic effect of oral fructose in humans during postprandial hyperglycemia.* Am. J. Clin. Nutr. 45: 580-587.
- Roden M, Price TB, Perseghin G, Petersen KF, Rothman DL, Cline GW, Shulman GI (1996).** *Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans.* J. Clin. Inv. 97: 2859-2865.
- Saltiel AR, Olefsky JM (1996).** *Thiazolidinediones in the treatment of insulin resistance and type II diabetes.* Diabetes 45: 1661-1669.
- Saltiel AR (2001).** *New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes.* Cell 104: 517-529.
- Salway JG (1999).** *Metabolism at a glance.* Blackwell Science, Oxford, 2<sup>nd</sup> edition: pp.104-107.
- Schick F, Eismann B, Jung WI, Bongers H, Bunse M, Lutz O (1993).** *Comparison of localized proton NMR signals of skeletal muscle and fat tissue in vivo: two lipid compartments in muscle tissue.* MRM 29:158-167.
- Schmitz-Pfeiffer C, Browne CL, Oakes ND, Watkinson A, Chisholm DJ, Kraegen EW, Biden TJ (1997).** *Alterations in the expression and cellular localization of protein kinase C isozymes are associated with insulin resistance in skeletal muscle of the high-fat fed rat.* Diabetes 46: 169-178.
- Schmalbruch H (1971).** *"Rote" Muskelfasern.* Z. Zellforschung 119: 120-146.
- Shmueli E, Alberti KG, Record CO (1993).** *Diacylglycerol/protein kinase C signalling: a mechanism for insulin resistance?* J. Intern. Med. 234: 397-400.
- Shulman GI (2000).** *Cellular mechanisms of insulin resistance.* J. Clin. Inv. 106: 171-176.
- Song XM, Ryder JW, Kawano Y, Chibalin AV, Krook A, Zierath JR (1999).** *Muscle fiber type specificity in insulin signal transduction.* Am. J. Physiol. 277: R1690-R1696.
- Spiegelman BM (1998).** *PPAR- $\gamma$ : adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor.* Diabetes 47: 507-514.
- Sreenan S, Sturis J, Pugh W, Burant CF, Polonsky KS (1996).** *Prevention of hyperglycemia in the Zucker Diabetic Fatty Rat by treatment with metformin or troglitazone.* Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 271: E742-E747.



- Staels B, Dallongeville J, Auwerx J, Schoonjans K, Leitersdorf E, Fruchart JC (1998).** *Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism.* Circulation 98: 2088-2093.
- Storlien LH, James DE, Burleigh KM (1986).** *Fat feeding causes widespread in vivo insulin resistance, decreased energy expenditure, and obesity in rats.* Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 251: E576-E583.
- Storlien LH, Kraegen EW, Jenkins AB, Chisholm DJ (1988).** *Effects of sucrose vs starch diets on in vivo insulin action, thermogenesis and obesity in rats.* Am. J. Clin. Nutr. 47: 420-427.
- Storlien LH, Jenkins AB, Chisholm DJ, Pascoe WS, Khouri S, Kraegen EW (1991).** *Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats. Relationship to muscle triglyceride and omega-3 fatty acids in muscle phospholipid.* Diabetes 40: 280-289.
- Strong P, Anderson R, Coates J, Ellis F, Evans B, Gurden MF, Johnstone J, Kennedy I, Martin DP (1993).** *Suppression of non esterified fatty acids and triacylglycerol in experimental animals by the adenosine analogue GR79236.* Clin. Sci. 84: 663-669.
- Szczepaniak LS, Babcock EE, Schick F, Dobbins RL, Garg A, Burns DK, McGarry JD, Stein DT (1999).** *Measurement of intracellular triglyceride stores by <sup>1</sup>H-spectroscopy: validation in vivo.* Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 276: E977-E989.
- Terrettaz J, Jeanrenaud B (1983).** *In vivo hepatic and peripheral insulin resistance in genetically obese (fa/fa) rats.* Endocrinology 112: 1346-1351.
- Terrettaz J, Assimacopoulos-Jeannet F, Jeanrenaud B (1986).** *Severe hepatic and peripheral insulin resistance as evidenced by euglycemic clamps in genetically obese fa/fa rats.* Endocrinology 118: 674-678.
- The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus (1997).** *Report of the Expert Committee on the diagnosis and classification of Diabetes Mellitus.* Diabetes Care 20: 1183-1197.
- Thiebaud D, DeFronzo RA, Jacot E, Golay A, Acheson K, Maeder E, Jequier E, Felber JP (1982).** *Effect of long chain triglyceride infusion on glucose metabolism in man.* Metab. Clin. Exp. 31: 1128-1136.
- Thompson AL, Cooney GJ (2000).** *Acyl-CoA inhibition of hexokinase in rat and human skeletal muscle is a potential mechanism of lipid-induced insulin resistance.* Diabetes 49: 1761-1765.

- Thorburn AW, Storlien LH, Jenkins AB, Khouri S, Kraegen EW (1989).** *Fructose-induced in vivo insulin resistance and elevated plasma triglyceride levels in rats.* Am. J. Clin. Nutr. 49: 1155-1163.
- Thresher JS, Podolin DA, Wei Y, Mazzeo RS, Pagliassotti MJ (2000).** *Comparison of the effects of sucrose and fructose on insulin action and glucose tolerance.* Am. J. Physiol. Reg. Int. Comp. Physiol. 279: R1334-R1340.
- Tippett PS, Neet KE (1982).** *Specific inhibition of glucokinase by long chain acyl coenzymes A below the critical micelle concentration.* J. Biol. Chem. 257: 12839-12845.
- Tippett PS, Neet KE (1982).** *An allosteric model for the inhibition of glucokinase by long chain acyl coenzyme A.* J. Biol. Chem. 257: 12846-12852.
- Unger RH (1995).** *Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM. Genetic and clinical implications.* Diabetes 44: 863-870.
- Unger RH, Orci L (2001).** *Diseases of liporegulation: new perspective on obesity and related disorders.* FASEB J. 15: 312-321.
- Upton R, Widdowson PS, Ishii S, Tanaka H, Williams G (1998).** *Improved metabolic status and insulin sensitivity in obese fatty (fa/fa) Zucker rats and Zucker Diabetic Fatty (ZDF) rats treated with the thiazolidinedione, MCC-555.* Br. J. Pharmacol. 125: 1708-1714.
- Van der Graaf PH, van Schaick EA, Visser SAG, de Greef HJMM, Ijzerman P, Danhof M (1999).** *Mechanism-based pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of antilipolytic effects of adenosine A1 receptor agonists in rats: prediction of tissue-dependent efficacy in vivo.* J. Pharmacol. Exp. Ther. 290: 702-709.
- Van Herck H, Baumans V, Brandt CJWM, Hesp APM, Sturkenboom JH, van Lith HA, van Tintelen G, Beynen AC (1998).** *Orbital sinus blood sampling in rats as performed by different animal technicians: the influence of technique and expertise.* Laboratory Animals 32: 377-386.
- Van Schaick EA, Tukker HE, Roelen HCPF, Ijzerman AP, Danhof M (1998).** *Selectivity of action of 8-alkylamino analogues of N-CPA in vivo: haemodynamic versus anti-lipolytic responses in rats.* Br. J. Pharm. 124: 607-618.
- Van Schaick EA, Zuideveld KP, Tukker HE, Langemeijer MWE, Ijzerman AP, Danhof M (1998).** *Metabolic and cardiovascular effects of the adenosine A1 agonist SPA in diabetic Zucker rats.* J. Pharm. Exper. Therap. 287: 21-30.

- Wagman AS, Nuss JM (2001).** *Current therapies and emerging targets for the treatment of diabetes.* Curr. Pharm. Des. 7: 417-450.
- Wang CS, McConathy WJ, Kloer HU, Alaupovic P (1985).** *Modulation of lipoprotein lipase activity by apolipoproteins. Effect of apolipoprotein C-III.* J. Clin. Invest. 75: 384-390.
- Warram JH, Martin BC, Krolewski AS, Soeldner JS, Kahn CR (1990).** *Slow glucose removal rate and hyperinsulinemia precede the development of type II diabetes in the offspring of diabetic patients.* Ann. Intern. Med. 113: 909-915.
- Ye JM, Doyle PJ, Iglesias MA, Watson DG, Cooney GJ, Kraegen EW (2001).** *Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation lowers muscle lipids and improves insulin sensitivity in high fat-fed rats.* Diabetes 50: 411-417.
- Zavaroni I, Chen Y-DI, Reaven GM (1982).** *Studies of the mechanism of fructose-induced hypertriglyceridemia in the rat.* Metabolism 31: 1077-1083.
- Zavaroni I, Bonara E, Pagliara M, Pagliara M, Dall'Aglio E, Luchetti L, Buonanno G, Bonati PA, Bergonzani M, Gnudi L, Passeri M, Reaven G (1989).** *Risk factors for coronary artery disease in healthy persons with hyperinsulinemia and normal glucose tolerance.* N. Engl. J. Med. 320: 702-706.
- Zhou YP, Cockburn BN, Pugh W, Polonsky KS (1999).** *Basal insulin hypersecretion in insulin-resistant Zucker Diabetic and Zucker Fatty Rats: role of enhanced fuel metabolism.* Metabolism 48: 857-864.
- Zierath JR, Houseknecht KL, Gnudi L, Kahn BB (1997).** *High-fat feeding impairs insulin-stimulated GLUT4 recruitment via an early insulin-signaling defect.* Diabetes 46: 215-223.
- Zucker LM (1965).** *Hereditary obesity in the rat associated with hyperlipidemia.* Ann. NY. Acad. Sci. 131: 447-458.

## VII Danksagung

Zu guter Letzt möchte ich mich bei all jenen herzlich bedanken, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

An erster Stelle sei **PD Dr. Andreas W. Herling** genannt für die Überlassung des Themas, die unermüdliche Beantwortung aller Fachfragen und die engagierte und freundliche Betreuung bei der Versuchsdurchführung und der Erstellung dieser Dissertation,

Dank an *Prof. Dr. Dr. Werner Kramer*, der die Anfertigung meiner Dissertation in der Disease Group Metabolic Diseases ermöglichte und meine Arbeit als externer Betreuer begutachtete,

an *Prof. Dr. Ernst Petzinger* für die Vertretung der Arbeit am Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen,

an *Elke Kleinschmidt* und *Marion Stein* für die intensive Einarbeitung, das harmonische Arbeitsklima und ihre ständige Unterstützung und Hilfestellung,

an *DI Ulrich Belz*, *DI Jürgen Kalisch*, *Dr. Claudia Neumann-Haefelin* und *PD Dr. Hans-Paul Juretschke* für die gemeinsame Planung, Durchführung und Auswertung der MRS-Messungen sowie viele fruchtbare Diskussionsrunden,

an *Dr. Manuela Stolte* und *DI Ute Geis* für die mikroskopischen Untersuchungen, an *das Labor Dr. Martin Gerl*, *das Labor Prof. Dr. Jürgen Sandow* und *das Labor Dr. Hans-Ludwig Schäfer* für die analytische Bestimmung all der Proben,

an *Dr. Guido Haschke* für seine Hilfe bei der Formatierung der Dissertation,

an alle Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter aus der Pharmakologie der Disease Group Metabolic Diseases von Aventis Pharma, die einen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet oder einfach nur für ein harmonisches Arbeitsklima gesorgt haben, insbesondere an *Jörn Wand-schneider, Michael Stapf, Kerstin Kleinschmidt, Thomas Hennig, Manfred Schmalz, Dr. Ulrich Werner* und *Jürgen Schwenke*, der mich bei PC-Problemen aller Art nur zu oft „gerettet“ hat,

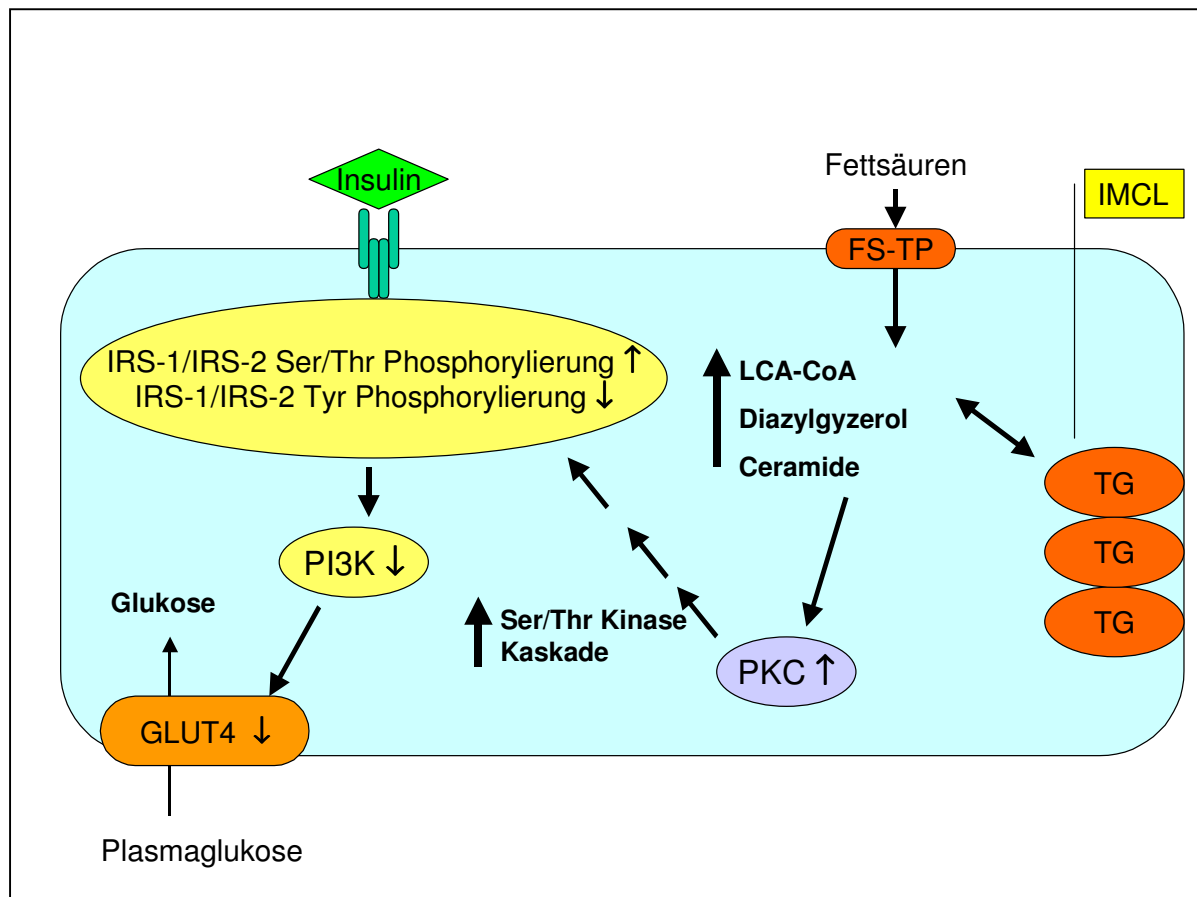
an meine Ex-Kommilitoninnen und jetzigen Kolleginnen, *Melanie an Haack, Alexandra Steinbrück* und *Dr. Daniela Leitzbach*, die zeitgleich ihre Dissertation anfertigten und so unersetzliche Gesprächs- und Diskussionspartnerinnen für mich waren,

an ***meine Eltern Ursel & Reinhard Kuhlmann***, die mich während des ganzen Studiums und der Promotion in jeder Hinsicht unterstützt haben,

und an ***meinen Freund Georg***, der mich während der Fertigstellung der Dissertation unterstützt hat.

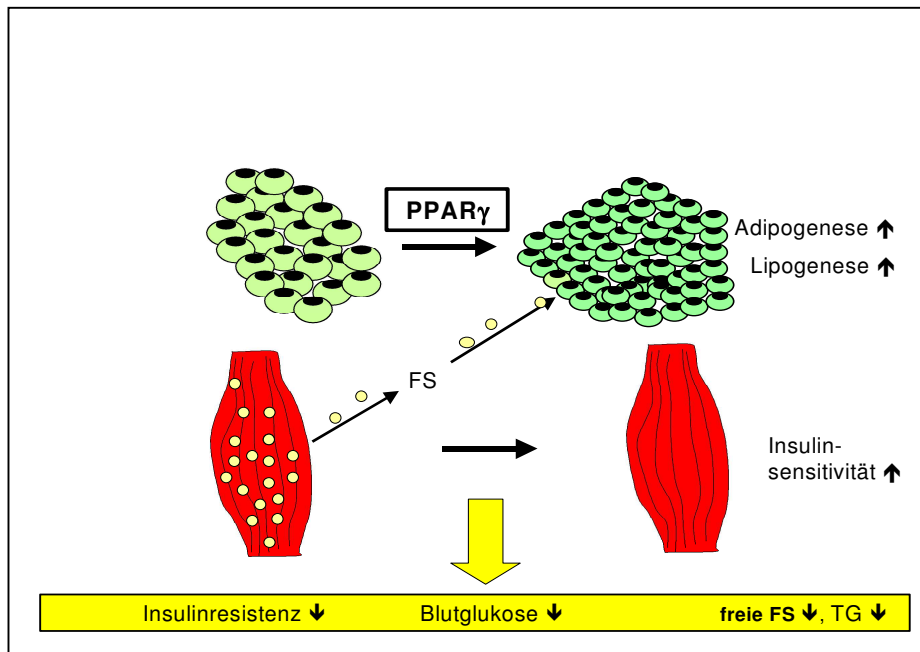
## VIII Anhang

## Modulation der Insulin-Signalkaskade

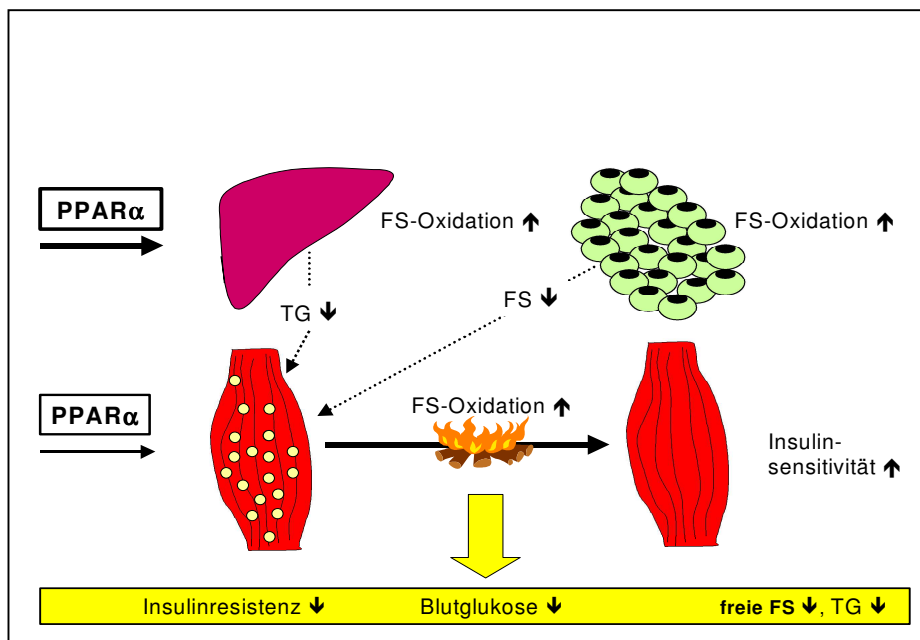


**Abb.VIII-1 Möglicher Mechanismus der Lipid-induzierten Insulinresistenz in der Skelettmuskelzelle.** Erhöhte Spiegel intrazellulärer Fettsäure-Metabolite (LCA-CoA, Diacylglycerol, Ceramide) aktivieren über die Proteinkinase C (PKC) eine Serin-/Threonin-Kinase-Kaskade, was zur Phosphorylierung von Serin-/Threonin-Bindungsstellen an Insulin Rezeptor Substraten (IRS) führt. Die Serin-phosphorylierten Formen der Substratproteine aktivieren die PI3-Kinase (PI3K) nur vermindert. Dies hat eine herabgesetzte GLUT4-Translokation zur Zellmembran und eine verminderte Aufnahme von Glukose in die Muskelzelle zur Folge; IMCL – Intramyozelluläres Lipid, TG – Triglyzeride, FS-TP – Fettsäure-Transporter-Proteine, Ser – Serin, Thr – Threonin, Tyr – Tyrosin, LCA-CoA – langkettig aktivierte Fettsäuren (nach Shulman, 2000).

## PPAR-Wirkmechanismen



**Abb.VIII-2 Möglicher pharmakologischer Effekt der PPAR $\gamma$ -Agonisten.** Über eine Umverteilung des in der Skelettmuskulatur abgelagerten Lipids in die Fettdepots wird die periphere Insulinsensitivität erhöht; PPAR $\gamma$  - Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptor gamma, FS - Fettsäuren, TG - Triglyzeride.



**Abb.VIII-3 Möglicher pharmakologischer Effekt der PPAR $\alpha$ -Agonisten.** Über eine gesteigerte Fettsäure-Oxidation in der Leber wird das Lipidangebot reduziert, Lipid-Speicher in der Skelettmuskulatur werden mobilisiert und so die periphere Insulinsensitivität gesteigert; PPAR $\alpha$  - Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptor alpha, FS - Fettsäuren, TG - Triglyzeride.